

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

CONCENTRATION, PURIFICATION ET ANALYSE DE TROIS BACTÉRIOPHAGES

par R. WAHL, KI YONG LEE et E. BARBU (*).

(Institut Pasteur, Paris)

Les acides désoxyribonucléiques des phages de la série T, actifs sur *E. coli* B ont été analysés par différents auteurs et on a constaté qu'ils différaient de ceux de la bactérie-hôte par les proportions respectives des bases puriques et pyrimidiques et parfois par la nature de ces bases [1, 2, 3].

Nous avons analysé les acides nucléiques des phages actifs sur d'autres espèces bactériennes, c'est-à-dire *Salmonella enteritidis* var. Danysz, *Salmonella typhimurium* et *Micrococcus pyogenes* (staphylocoque) et nos résultats sont différents sur certains points.

Phages étudiés :

Phage D4/2 multiplié sur une souche de *S. enteritidis* var. Danysz (souche n° 2) provenant du Service des Vaccins de l'Institut Pasteur. Ce phage a été isolé dans le laboratoire à partir d'eau d'égout et entraîné immédiatement sur la souche n° 2 de *S. enteritidis*.

Il a été étudié antérieurement [4] et des photographies au microscope électronique ont été publiées [5].

D'après ces photographies, le diamètre moyen de la tête peut être évalué à 400 Å.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 juin 1956

Phage 294/2. Isolé par passages sur *S. typhimurium*, puis sur *S. enteritidis* (grâce à l'aspect particulier de ses plages) à partir d'un mélange de phages, que nous devons à l'amabilité de Boulgakov et portant le n° 294. Quelques photos au microscope électronique faites par Giuntini ont montré que ce phage a un diamètre de l'ordre de 600 Å.

Phage S₃K provenant de la collection de Eugène Wollman ; il est multiplié sur la souche Mercier 320 de *M. pyogenes*.

TECHNIQUES.

1° TITRAGES ET DOSAGES DANS LES PRÉPARATIONS. — Les titrages de phages ont été faits par la méthode de Gratia (1) [6, 7], les dosages d'azote par la méthode de Kjeldahl, ceux de phosphore par celle de King [8]. L'acide désoxyribonucléique (ADN) a été dosé par la méthode de Dische [9].

2° PRÉPARATION DES LYSATS. — Les lysats sont préparés par fractions d'un l en eau peptonée (additionnée pour le staphylocoque de 3 p. 1 000 de glucose). Le milieu est placé dans un ballon de 2 l, additionné avant la stérilisation d'une solution de silicone antimousse dans l'éther. L'éther s'évapore à l'autoclave. Les cultures sont placées dans une étuve à 37°. Des bulles d'air comprimé sont produites au fond du ballon au travers d'une sphère percée de trous. L'ensemencement est fait avec une culture de dix-huit heures et le phage est introduit un temps déterminé après les bactéries.

Le titre des lysats, pour des raisons pratiques (débit de la Sharples, capacité des tubes à centrifuger), doit être de 10^{11} phages/ml au moins. Cependant, on a parfois utilisé des lysats de titre un peu inférieur en les mélangeant à d'autres de titre plus élevé. Il est évidemment avantageux que le titre soit encore plus élevé, ce qui a été souvent obtenu (5×10^{11}). Dans un premier stade, on prépare des lysats de plus en plus concentrés par passages successifs sur la souche.

Pour chaque phage, des essais préalables ont déterminé les conditions permettant d'obtenir les titres les plus élevés. Ce sont les suivantes :

Pour *D4/2*, ensemencement de 1×10^9 bact/ml à partir d'une culture liquide et, une heure après, introduction de 5×10^8 à 5×10^9 ph/ml. L'incubation est prolongée pendant un temps variant de six heures trente à sept heures après l'introduction du

(1) Les résultats des titrages sont reproductibles à moins de 15 p. 100 près.

phage. Dans ces conditions, la lyse est partielle et le titre du lysat est compris entre 2×10^{11} et 6×10^{11} .

Pour 294/2, ensemencement d'environ 5×10^8 bact/ml à partir d'une culture liquide et, une heure après, introduction de 3×10^8 à 5×10^9 ph/ml. Après l'introduction du phage, incubation prolongée pendant cinq heures trente. La lyse est partielle et le titre du lysat est entre 5×10^{10} et 3×10^{11} .

Pour S_3K , ensemencement de 1×10^9 bact/ml à partir d'une culture sur gélose (3 boîtes de Roux) et, deux heures à deux heures et demie après, introduction de 2×10^8 à 3×10^9 ph/ml. Une lyse à peu près totale se produit quatre heures à quatre heures et demie après l'introduction du phage. Le titre obtenu est entre 1×10^{11} et 3×10^{11} . Si les concentrations des phages et des bactéries sont différentes, les titres sont dix à cent fois plus faibles.

A partir de ce moment les opérations sont les mêmes pour les trois phages.

3° PURIFICATION DES PHAGES. — Les lysats sont laissés trois jours au moins à $+4^\circ$ pour laisser la libération de phages se compléter (le titre augmente légèrement). 3-4 l de chaque phage sont réunis, puis traités ensemble. La suite des opérations est effectuée dans les conditions de stérilité les meilleures possibles.

Le pH est de 6,6-7,8. On ajoute 3 p. 100 de celite 535, on agite légèrement ; puis, deux heures après, on filtre une ou deux fois sur une couche de 1 cm de celite tassée.

Le liquide est ainsi clarifié, même si la lyse est très incomplète, et il n'est pas nécessaire de centrifuger à faible vitesse. Le titre ne baisse pas, si ces conditions sont observées. On fait ensuite passer sur la celite un volume de solution de Ringer (0,14 M NaCl + 0,005 M KCl + 0,0025 M CaCl_2 + 0,0024 M CO_3NaH) égal au 1/10 de celui du lysat qu'on ajoute au filtrat. On acidifie ensuite par HCl jusqu'à pH 5,5.

On centrifuge à 50 000 t/min en Sharples refroidie (bol de diamètre 4,5 cm) avec un débit de 10 ml/min, puis on fait passer dans les mêmes conditions 300 à 500 ml de Ringer, ce qui produit une première purification. A l'arrêt de la centrifugation, une partie des phages déposés se remet toujours en suspension, de sorte qu'il a fallu renoncer à les recueillir sur les parois du bol. On les remet donc en suspension dans le liquide qui reste dans le bol (130 cm³) et on laisse une nuit à 4° C. Cette suspension est trouble et contient environ 9/10 des phages centrifugés, sous un volume vingt à trente fois plus petit, c'est-à-dire environ 2×10^{12} à 4×10^{12} ph/ml.

Après seize heures à 4° C on centrifuge à froid, dans une centrifugeuse angulaire à 5 000 t/min. Le titre ne baisse pas.

On centrifuge ensuite à 2° C pendant une heure à 25 000 *g* (centrifugeuse Internationale). Les surnageants contiennent de 10 à 15 p. 100 de l'activité et les culots se présentent comme des gels transparents qu'on laisse gonfler ensuite pendant quelques heures dans une solution de Ringer avant de les disperser complètement par agitation légère. Ces suspensions sont gardées vingt-quatre heures à 4° C, puis centrifugées à 5 000 t/min pendant trente minutes. On effectue encore deux centrifugations à 25 000 *g* suivie chacun d'une centrifugation à 5 000 t/min.

Selon la quantité de Ringer ajoutée pour disperser les gels de phages on obtient des suspensions contenant de 2 à 8×10^{13} ph/ml. On effectue sur ces suspensions des dosages d'azote, de phosphore et d'ADN.

4° DÉTERMINATION DES BASES PURIQUES ET PYRIMIDIQUES DES ADN.

— a) *Extraction et purification des ADN.* — La suspension de phages, titrant environ 5×10^{13} ph/ml, est précipitée par deux volumes d'alcool à 95°. Les phages sont lavés ensuite avec de l'alcool à 80°, puis avec de l'alcool absolu et enfin avec de l'éther. Les ADN sont extraits par la soude normale à 37° suivant la méthode de Smith et Wyatt [10]. Dans certains cas, pour le phage D4/2 on a utilisé, au lieu de la soude, l'extraction par une pression hydrostatique de 8 000 kg/cm² pendant trente minutes, suivant une technique déjà décrite [41], puis les opérations ont été continuées de la même façon.

Le surnageant contenant l'ADN refroidi et acidifié à pH 4 est précipité par deux volumes d'alcool et centrifugé. Le précipité est remis en suspension dans une solution de chlorure de sodium molaire légèrement alcalinisée et les protéines sont éliminées par la méthode de Sevag [42].

L'ADN est enfin précipité à nouveau par l'alcool, lavé, puis desséché par l'alcool absolu et l'éther.

b) *Analyse des ADN.* — Elle est faite d'après le procédé décrit dans un travail précédent [43].

RÉSULTATS.

I. DEGRÉ DE PURIFICATION DES PRÉPARATIONS. — L'étude n'a été faite que pour le phage D4/2.

1° *Dosages d'azote et de phosphore.* — Le phage D4/2 est très résistant et s'inactive beaucoup moins que d'autres au cours des centrifugations successives. On peut donc suivre la purification au cours de ces centrifugations en calculant après chacune les

rapports : N/Ph actifs, P/Ph actifs (2). On voit dans le tableau I qu'ils restent constants après la deuxième centrifugation.

Mais cela n'indique pas le degré de purification atteint. En effet, ces rapports peuvent être rendus plus grands par deux causes : soit par des impuretés provenant de la lyse des bactéries, soit par la présence de phages inactifs.

Dans la première alternative les rapports azote sur phosphore auraient des chances d'être plus grands, les bactéries ayant un rapport N/P plus grand que celui du phage. Nous constatons dans nos préparations un rapport N/P assez constant. Mais ceci ne suffit pas pour conclure. On pourrait se rendre compte de la présence de phages inactifs en comparant les titres des suspensions aux numérations de particules de phages au microscope électronique, comme Luria l'avait fait [14].

Nous n'avons pas effectué de numérations de particules de phages au M. E. mais nous avons déterminé les dimensions du phage, ce qui nous permet de calculer son volume. Nous pouvons ainsi comparer le poids du phage (obtenu en multipliant son volume par sa densité) au rapport obtenu en divisant le poids sec d'une suspension de phages dialysée par le nombre de phages actifs obtenu par titrage.

Pour évaluer le volume du phage on peut l'assimiler à une sphère de 200 Å de rayon (celui-ci a été mesuré au microscope électronique). Sa densité est à peu près de 1,5 en considérant qu'il contient environ 50 p. 100 de protéines (densité 1,3) et 45 p. 100 d'acide nucléique (densité 1,8). Le volume du phage est environ $3,35 \times 10^{-17}$ cm³. Son poids est donc 5×10^{-17} g.

On peut en déduire une évaluation du poids moléculaire (P. M.) du phage qui serait de 30×10^6 .

Pour calculer le rapport $\frac{\text{poids sec}}{\text{ph. actifs}}$ nous avons utilisé une préparation quatre fois centrifugée à l'Internationale, puis dialysée sans agitation pendant une semaine contre eau bidistillée à + 4° C. La plus grande partie des sels était éliminée : mais il en restait probablement la minime quantité nécessaire pour conserver la cohésion des phages.

Le poids sec était de $6,5 \times 10^{-3}$ g/ml, dont 14,4 p. 100 d'azote. Le nombre de phages actifs, 6×10^{13} ml, était évalué avant la

(2) On remarque que la quantité de phosphore et d'azote par phage est environ trois à cinq fois moindre que celle des phages de la série T, d'après les chiffres donnés dans une revue de Cohen [21]. Ceci pourrait s'expliquer d'une part parce que le phage D4/2 est plus petit et d'autre part, comme nous le verrons, parce que notre préparation paraît contenir moins de phages inactifs.

dialyse, car au cours de celle-ci 73 p. 100 des phages (3) étaient inactivés.

Le rapport $\frac{\text{poids sec}}{\text{ph. actifs}}$ était de $10,8 \times 10^{-17}$ g, environ le double du poids du phage calculé d'après ses dimensions et sa densité.

De même, si la préparation ne contenait rien d'autre que des phages actifs, le P. M. d'un phage serait de 65×10^6 au lieu de 30×10^6 .

Pour diverses préparations non dialysées (n^{os} 1, 2, 3, 4) ayant subi un nombre variable de centrifugations à l'Internationale, une comparaison analogue a été faite. Mais, à cause de la présence de sels en grande quantité, le poids du phage (calculé

TABLEAU I (1)

	Nb. de (2) centrif. à 25.000 g	Ph actifs $\times 10^{13}$	N $\times 10^3$	P $\times 10^3$	N/P	N/Ph actif $\times 10^{17}$	F/ph actif $\times 10^{17}$
I	2	6×10^{13}	0,79	0,24	3,3	1,3	0,4
II	4	8×10^{13}	1,37	0,4	3,4	1,7	0,5
III	3	8×10^{13}	1,56	0,45	3,5	1,9	0,56
IV	3	7×10^{13}	1,09	0,32	3,4	1,5	0,45

TABLEAU II (1)

	Nb. de (2) centrif. à 25.000 g	N $\times 7$ ph. act. $\times 10^{17}$	P.M. ap. du ph. $\times 10^{-6}$
I	2	9,2	55
II	4	12	72
III	3	13	78
IV	3	10,3	65

(1) Les titrages de phages et les dosages d'azote et de phosphore sont rapportés à 1 ml. Quantités exprimées en grammes.

(2) Toutes les préparations ont subi en outre une centrifugation préalable dans la Sharples et des centrifugations intermédiaires à 5 000 t/min.

(3) Si la dialyse est prolongée plus longtemps, deux à trois semaines, ou aidée par agitation, l'inactivation est presque totale. De plus, les phages se désintègrent, libèrent leur acide désoxyribonucléique, comme on peut le constater par l'apparition d'une forte viscosité et les suspensions opalescentes de phages deviennent des gels transparents.

d'après les dimensions et la densité) était comparé non pas au rapport $\frac{\text{extrait sec}}{\text{ph. actifs}}$ mais au rapport $\frac{N \times 7}{\text{ph. actifs}}$ étant donné que le phage contient 14,4 p. 100 d'azote. On voit (tableau II) que les préparations contiennent plus ou moins de matière inactive.

Il semble bien qu'il s'agisse ici aussi de phages inactifs.

Le rapport $\frac{N \times 7}{\text{nb. de ph. actifs}}$ peut également servir à calculer un poids moléculaire apparent, que l'on peut comparer au poids moléculaire calculé d'après les dimensions du phage. Les résultats sont donnés dans le tableau II.

2° *Mesure de l'absorption au spectrophotomètre.* — Nous avons déterminé au spectrophotomètre l'absorption en lumière U. V. pour une seule préparation de phages D4. Le tableau III résume les résultats.

TABLEAU III

Préparation	P x 10 ⁶ (g/ml)	260 m μ (Densité optique x 10 ³)	280 m μ	400 m μ	D.O.260	D.O.260	D.O.260
					D.O.280	titres x 10 ¹²	P (p en g/l)
Ph. A	3,0	835	580	22	1,43	1,67	278
Ph. B	3,0	690	430	5	1,6		230
Ph. C	3,0	657	396	8	1,65		220
A.D.N. Thymus	1,0	212	110		1,92		212

Phage A - D4/2 quatre fois centrifugé à l'internationale et dilué, titre 5×10^{11} /ml.

Phage B - Le même après chauffage 10 minutes à 80°.

Phage C - Le même après compression 30 minutes à 6.600 Kg/cm2

Nous constatons que la valeur 278 du rapport de la densité optique à 260 mμ au poids en grammes de phosphore par litre est pour le phage D4 de même ordre de grandeur que celles de 255 et de 260 trouvées par Putnam pour les phages T6 et T6r [15, 16]. Il en est de même pour la valeur 280 que nous avons calculée d'après les résultats de Herriott sur le phage T2 [47].

Par contre, le rapport entre la densité optique à 260 mμ et le titre est nettement inférieur pour D4/2 à celui donné par Luria [44] pour T2, T4 et T6 ou celui que l'on peut calculer d'après les résultats de Herriott [47]. Ceci est dû au fait que D4/2 est plus petit et contient moins d'acide nucléique que les phages T2, T4 et T6.

Nous n'avons pas tenu compte dans ce calcul de l'influence de la diffusion des particules de phages sur la densité optique

mesurée. Comme l'indique Luria [14], cet effet peut atteindre 10 à 20 p. 100 de la valeur de la densité optique mesurée. Il est évident que cet effet intervient également dans le cas de D4/2, comme semble l'indiquer le fait que la densité optique diminue après compression ou chauffage. En effet, dans ces conditions, on sait que l'acide nucléique est libéré sous forme de minces filaments pour lesquels la diffusion est plus faible [41]. Après chauffage ou compression, le rapport entre la densité optique du phage et le phosphore se rapproche de celui de l'ADN du thymus.

II. ANALYSE DES ADN. — 1° *Quantité d'ADN du phage D4/2.* — La quantité d'ADN de diverses préparations de phage D4/2 a été dosée et le tableau IV montre les résultats. Un dosage d'ADN a été également fait en même temps que le poids sec sur une préparation dialysée et on a constaté que le phage contenait 45 p. 100 d'ADN (4). On a pu calculer alors l'équivalent du P. M. de la quantité d'ADN d'un phage. Il varie entre 25 et 33 millions.

TABLEAU IV

Préparation	Titre/ml	A.D.N. g/ml $\times 10^3$	P.M. ph $\times 10^{-6}$	P.M. A.D.N. du ph. $\times 10^{-6}$
I	6×10^{13}	2,4	55	25
II	8×10^{13}	4,3	72	32
III	8×10^{13}		78	33
IV	7×10^{13}	3,5	65	30

2° *Bases puriques et pyrimidiques.* — Dans les ADN des trois phages analysés nous avons trouvé seulement les quatre bases classiques.

Le tableau V indique les résultats des dosages des bases pour les phages et les bactéries-hôtes. Les résultats sont exprimés en molécules pour 100 molécules de bases totales.

On sait que les ADN contiennent en général des quantités équimoléculaires d'adénine et de thymine d'une part, de guanine et de cytosine d'autre part [13, 18]. Si la 5-hydroxyméthylcytosine remplace la cytosine elle est en quantité équivalente [4].

Les chiffres obtenus pour la guanine et la cytosine pour les phages D4 et 294/2 (surtout pour le premier) s'écartent légèr-

(4) Notons que Herriott trouve plus de 50 p. 100 d'ADN dans le phage T2, alors que Taylor [23] et Cohen [22] en trouvent environ 40 p. 100 dans plusieurs phages de la série T.

ment mais significativement l'un de l'autre. Cet écart pourrait s'expliquer par la présence d'une quantité minime d'une base détruite par l'hydrolyse, par exemple la 5-hydroxyméthylcytosine en trop petite quantité pour être décelée même après hydrolyse par l'acide formique à 88 p. 100.

Par ailleurs, dans les phages 294/2 et S₃K le rapport purines sur pyrimidine ne s'écarte pas significativement de l'unité. Il en est de même pour la plupart des ADN des phages [21] et des bactéries analysés [13].

TABLEAU V

Phages	Adénine	Thymine	Guanine	Cytosine	$\frac{A + T}{G + C}$
D4	26,3	25,1	26,4	22,2	1,06
294/2	27,8	28,6	23,3	20,9	1,26
S ₃ K	35,1	35,0	15,1	14,8	2,34
<u>Bactéries</u>					
Sal. ent.	24,9	25,1	25,0	25,0	1,00
M. pyogenes	34,2	34,6	16,1	15,1	2,2

TABLEAU VI

	NaCl	Adénine	Thymine	Guanine	Cytosine	$\frac{A + T}{G + C}$
Expérience 1	0,5 M	26,0	25,7	26,2	22,1	1,07
	1,0 M	26,2	26,2	25,6	22,0	1,10
Expérience 2	0,5 M	26,0	25,3	26,2	22,5	1,05
	1,0 M	26,1	26,0	25,7	22,2	1,09

Au contraire, pour le phage D4/2 ce rapport est de 1,11 significativement supérieur à l'unité, ce qui résulte du fait que la quantité de cytosine est plus faible que celle de guanine.

3° *Rapports adénine + thymine sur guanine + cytosine.* — Ces rapports sont différents pour chaque phage et celui du phage du staphylocoque s'écarte considérablement des deux autres. Ils sont assez proches des mêmes rapports pour la bactérie-hôte. Pour les phages D4/2 et S₃K, il n'y a pas de différence significative, à ce point de vue, entre le phage et la bactérie. Pour 294/2 il y a une différence. Nous y reviendrons à la discussion.

4° *Essai de fractionnement de l'ADN.* — A partir de l'ADN extrait en comprimant à 8 000 kg/cm² pendant une demi-heure une suspension de phage D4, on a essayé d'obtenir des fractions par passage sur colonne de celite sur laquelle on a fixé de l'histone d'après Brown [19].

Comme l'indique le tableau VI, la différence entre la fraction éluee par NaCl 0,5 M et la fraction éluee par NaCl 1,0 M est trop faible pour être significative.

DISCUSSION.

I. *Pureté des préparations. Phages inactifs.* — Le degré de pureté de la préparation du phage D4/2 a été estimé par comparaison du rapport $\frac{\text{poids sec}}{\text{nb. ph. act.}}$ avec la valeur du poids du phage calculée d'après le diamètre et la densité.

Il faut admettre une importante marge d'erreur dans la mesure du diamètre qui, pour le phage D4, avait été estimé dans un travail précédent comme compris entre 400 et 500 Å [5].

Si le diamètre réel était de 500 Å, la concordance serait parfaite entre le poids du phage ainsi calculé et le poids de matière par phage dans les préparations.

Mais le diamètre paraît actuellement (en mesurant plusieurs phages en contact) plus près du minimum indiqué (400 Å). Par contre, il ne lui est certainement pas inférieur. Le poids réel du phage est donc probablement supérieur à celui que nous avons calculé avec le diamètre 400 Å. Par conséquent, la préparation contient au moins 50 p. 100 de phages actifs et peut-être beaucoup plus. Le fait que le rapport N/P reste constant au cours des dernières centrifugations à 25 000 g nous a fait supposer que la différence est constituée par des phages qui ne donnent pas de plages. La présence de ces phages peut être interprétée de trois façons :

1° Les phages pourraient être réellement inactifs, produits dans cet état par la souche.

2° Les phages pourraient être potentiellement actifs, mais n'ayant pas donné de plages sur la souche dans les conditions du titrage. Le phénomène se rapporterait à ce qu'on a appelé « efficiency of plating » [7]. Il était peut-être la cause du désaccord signalé par Luria [14] entre les numérations des plages et les numérations des particules au microscope électronique, celles-ci donnant des chiffres plus élevés.

Les raisons pour lesquelles certaines particules potentiellement actives ne donnent pas de plages peuvent être très variées :

agrégats, anomalie de l'absorption sur les bactéries, influence du milieu, etc.

3° Les phages pourraient être inactivés au cours des manipulations. Il paraît probable qu'une certaine partie des phages sont ainsi inactivés quand les centrifugations dans l'Internationale sont répétées. En effet, à partir de la deuxième centrifugation on constate que les poids d'azote et de phosphore par phage actif augmentent alors que le rapport N/P reste constant.

Si l'on refait, avec les chiffres trouvés dans la littérature [17, 20, 21], les calculs que nous avons faits pour nos phages, on voit que le poids du phage, calculé d'après la quantité d'azote de la préparation, s'écarte encore beaucoup plus que dans nos préparations du poids du phage calculé d'après son volume et sa densité.

II. *Analyse des ADN.* — Dans les phages T2, T4 et T6 (mais non dans T3 et T5) la cytosine est remplacée par le 5-hydroxyméthylcytosine, celle-ci étant elle-même en quantité égale à la guanine [4, 2, 3]. Chez les phages D4/2, 294/2 et S₃K nous n'avons trouvé que les quatre bases classiques.

En ce qui concerne le rapport $\frac{A+T}{G+C}$ on trouve entre les divers phages des différences comme il y en a chez les bactéries [13]. D'un autre côté, en comparant le rapport chez une bactérie-hôte à celui qu'on observe chez les phages reproductibles sur cette bactérie, on constate qu'il existe des cas très variés. Ainsi pour *E. coli* ce rapport est égal à 1, tandis que pour les phages T2, T4 et T6 il est compris entre 1,79 et 1,93; pour T5 il est de 1,57 [2], enfin pour T3 il est égal à 1 [3]. Pour le phage 294/2, il y a une différence significative avec 1, mais elle est faible. Par contre, pour deux des phages analysés D4 et S₃K nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les rapports $\frac{A+T}{G+C}$ du phage et de la bactérie-hôte.

Ces dernières constatations sont importantes, car la valeur de ce rapport paraît être chez les bactéries un caractère d'espèce et même souvent un caractère de genre (tout au moins il est de même ordre de grandeur chez les diverses espèces du même genre) [13]. Le genre *Salmonella* et le genre *Micrococcus* (5) se distinguent l'un de l'autre par la valeur beaucoup plus grande du rapport chez le second que chez le premier. Il est d'autant plus remarquable que chez un phage de *Salmonella* et un phage de staphylocoque ils aient la même valeur que chez les bactéries du genre correspondant.

(5) En excluant de ce genre *Micrococcus lysodeikticus*, comme il a été proposé dans un mémoire précédent [13].

Bien que deux phages seulement sur trois aient montré cette identité de composition, ces considérations lui donnent une valeur particulière et elle peut être considérée comme un argument en faveur d'une parenté plus étroite entre ces phages et leur bactérie-hôte que dans le cas de la plupart des phages de la série T.

RÉSUMÉ.

1° Les phages D4/2 de *S. enteritidis* var. Danysz, 294/2 de *Sal. typhimurium* et S₃K de *Micrococcus pyogenes* ont été purifiés et analysés.

2° Des lysats de titre élevé ont été préparés, purifiés et concentrés par filtration et centrifugation différentielle, les ADN ont été extraits et analysés.

3° Le degré de purification a été évalué en comparant le poids du phage calculé d'après la teneur en azote et phosphore au poids du phage calculé d'après ses dimensions et sa densité.

4° L'analyse montre qu'ils contiennent les quatre bases classiques : adénine, guanine, thymine et cytosine.

Le rapport $\frac{\text{bases puriques}}{\text{bases pyrimidiques}}$ est à peu près égal à 1.

Les rapports adénine + thymine sur guanine + cytosine sont égaux à ceux de la bactérie-hôte pour les phages D4/2 et S₃K, ce qui est important, car ils sont pour ces bactéries respectivement de 1,0 et de 2,2, et ces valeurs sont caractéristiques du genre bactérien correspondant. Ces résultats diffèrent de la plupart de ceux qui ont été obtenus chez les phages analysés jusqu'ici, pour lesquels il existe de très notables différences à ce point de vue entre le phage et la bactérie-hôte.

Il y aurait donc deux catégories de phages correspondant peut-être à des origines différentes.

Les essais de fractionnement des ADN du phage D4 n'ont pas permis d'obtenir des fractions différant entre elles par leur composition.

SUMMARY

CONCENTRATION, PURIFICATION AND ANALYSIS OF THREE BACTERIOPHAGES.

Phages D4/2 of *S. enteritidis* var. Danysz, 294/2 of *S. typhimurium* and S₃K of *Micrococcus pyogenes* have been purified and submitted to analysis. Lysates of high titer have been prepared, purified and concentrated by filtration and differential centrifugation and the desoxyribonucleic acids (DNA) extracted and analysed. The degree of purification has been evaluated by

comparing the weight of the phage calculated from N and P contents with the same calculated from its dimensions and density. Analysis shows that the phages contain the four classical bases : adenine, guanine, thymine and cytosine. The proportion $\frac{\text{purine bases}}{\text{pyrimidine bases}}$ is about 1. The proportion $\frac{\text{adenine} + \text{thymine}}{\text{guanine} + \text{cytosine}}$ is the same as in the host bacterium in the case of phages D4/2 and S₃K. These proportions are 1,0 and 2,2 respectively for these bacteria. This is of importance, for the figures characterize the corresponding bacterial genus. Our results are different from most of those hitherto obtained by different authors with other phages. The existence of two categories of phages, perhaps of different origin, is suggested. We were not successful in fractionating the DNA of phage D4.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] WYATT (G. R.) et COHEN (S. S.). *Biochem J.*, 1953, **55**, 774.
- [2] WYATT (G. R.) et COHEN (S. S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 143.
- [3] KNIGHT (C. A.). *Adv. Virus Research*, 1954, **2**, 153.
- [4] WAHL (R.), TERRADE (A.) et MONCEAUX (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 429.
- [5] GIUNTINI (J.), BARBU (E.) et WAHL (R.). *Bull. Microscopie appl.*, 1955, **5**, 24.
- [6] GRATIA (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1936, **57**, 652.
- [7] ADAMS (M. H.). *Methods in Medical Research*, 1950, **2**, 3
- [8] KING (E. J.). *Biochem. J.*, 1932, **26**, 292.
- [9] DISCHE (Z.). *Mikrochemie*, 1930, **8**, 4.
- [10] SMITH (J. D.) et WYATT (G. R.). *Biochem. J.*, 1951, **49**, 144.
- [11] BARBU (E.), BASSET (J.), JOLY (M.) et WAHL (R.). *J. Polymer. Sci.* (sous presse).
- [12] SEVAG (M. G.), LACKMANN (D. B.) et SMOLENS (J.). *J. biol. Chem.*, 1938, **124**, 425.
- [13] LEE KI YONG, WAHL (R.) et BARBU (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 212.
- [14] LURIA (S. E.), WILLIAMS (R. C.) et BACKUS (R. C.). *J. Bact.*, 1951, **61**, 179.
- [15] PUTNAM (F. W.), KOZLOFF (L. M.) et NEIL (J. C.). *J. biol. Chem.*, 1949, **179**, 303.
- [16] PUTNAM (F. W.), MILLER (D.), PALM (L.) et EVANS (E. A.). *J. biol. Chem.*, 1952, **199**, 177.
- [17] HERRIOTT (R. M.) et BARLOW (J. L.). *J. gen. Physiol.*, 1952, **36**, 17.
- [18] CHARGAFF (E.). *Experientia*, 1950, **6**, 201.
- [19] BROWN (G. L.) et WATSON (M.). *Nature*, 1953, **172**, 339.
- [20] PUTNAM (F. W.). *Adv. Protein Chem.*, 1953, **8**, 175.
- [21] COHEN (S. S.). *Adv. Virus Research*, 1955, **3**, 1.
- [22] COHEN (S. S.) et ANDERSON (T. F.). *J. exp. Med.*, 1946, **84**, 511.
- [23] TAYLOR (A. R.). *J. biol. Chem.*, 1946, **165**, 271.

**ÉTUDE DE L'APTITUDE
D'*ANOPHELES MACULIPENNIS ATROPARVUS*
A INOCULER AU LAPIN LES SOUCHES ATTENUÉES
DE VIRUS DU MYXOME INFECTIEUX**

par H. JACOTOT, C. TOUMANOFF, A. VALLÉE et B. VIRAT
[avec la collaboration technique de M^{me} MALMANCHE et de M^{lle} MAILLARD] (*)

(Institut Pasteur. Services de Microbiologie Animale
et de Pathologie des Insectes)

Dans un travail antérieur nous avons exposé les résultats de nos essais de transmission de la myxomatose au lapin par *A. maculipennis atroparvus* et par *Anopheles stephensi* : il s'agissait alors de la forme grave de la maladie, déterminée par le virus pleinement pathogène, qui, seul, avait été en cause jusque-là sur le territoire français [1].

Mais, parallèlement à nos essais, nous avons entrepris quelques expériences de transmission par l'insecte, de la souche atténuée d'Australie, dénommée Uriarra III, dont nous étudions les propriétés [2].

En avril 1955, nous avons isolé une première souche française de virus atténué sur un lapin domestique du Loiret et, depuis, de nombreux cas de myxomatose atypique ont été observés dans le pays. Poursuivant notre étude de transmission par les moustiques, nous avons alors utilisé deux souches atténuées de notre collection, la souche Loiret 55 et la souche Loir-et-Cher B. [3, 4].

Dans deux des expériences faites avec le virus Uriarra III nous avons employé *Aedes aegypti* ; tous les autres essais ont été effectués avec *Anopheles maculipennis atroparvus*, espèce zoophile dont on est en droit de penser qu'elle est, en France et probablement en d'autres pays d'Europe, un vecteur important de la myxomatose dans la nature.

TECHNIQUE DES OPÉRATIONS.

Le protocole expérimental a été le même que dans notre première série d'expériences, mais, dans le plus grand nombre des

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 octobre 1956.

LÉGENDE DU TABLEAU I

I. 10 insectes ont piqué les œdèmes palpébraux d'un lapin inoculé de myxomatose douze jours avant.

II. 4 insectes ont piqué les lésions nummulaires des oreilles d'un lapin qui avait contracté la myxomatose par cohabitation avec un malade.

III. 48 insectes ont piqué les œdèmes (oreille, scrotum, anus) de 3 lapins inoculés de myxomatose antérieurement, chaque moustique faisant deux repas infectants à deux ou trois jours d'intervalle.

IV. 7 insectes ont piqué les nodules auriculaires d'un lapin inoculé de myxomatose onze jours avant.

V. 14 insectes ont piqué l'œdème palpébral d'un lapin inoculé douze jours avant.

VI. 44 insectes ont piqué les œdèmes de 2 lapins inoculés de myxomatose antérieurement, chaque moustique faisant deux repas infectants à trois jours d'intervalle.

VII. Neuf jours après leur deuxième repas infectant, 41 moustiques survivants de l'essai précédent font à nouveau deux repas infectants à trois jours d'intervalle sur les œdèmes de 3 lapins inoculés antérieurement. Trois jours après le deuxième repas infectant, ils se gorgent sur des lapins antérieurement inoculés avec le virus du fibrome de Shope ; trois jours après, ils piquent des lapins reufs et enfin, quatre jours et sept jours plus tard, ils piquent à nouveau les lapins inoculés de virus de Shope sur lesquels ils s'étaient gorgés une première fois.

VIII. 42 insectes ont piqué les œdèmes (ano-génitaux) de 2 lapins inoculés antérieurement par voie testiculaire, chacun d'eux faisant deux repas infectants à trois jours d'intervalle. Trois jours après le deuxième repas infectant, ils se gorgent sur des lapins qui ont été inoculés avec le virus du fibrome de Shope six mois avant ; puis, quatre jours après, ils se gorgent sur des lapins neufs.

+ = lapins qui ont contracté la myxomatose.

0 = lapins qui n'ont pas contracté la myxomatose.

essais (voir légende du tableau I) les moustiques ont fait deux repas infectants à 2 ou 3 jours d'intervalle, avant d'être mis en présence de lapins neufs ; en procédant ainsi, nous pensions améliorer les conditions de l'expérimentation sans nous éloigner des conditions naturelles, car il n'est pas douteux que, dans les foyers épizootiques, nombreux sont les insectes qui se gorgent deux ou plusieurs fois consécutives sur des malades.

Les moustiques ont piqué les lapins neufs aux oreilles et sur le nez, le plus souvent, mais, dans quelques cas aussi, à la commissure interne des paupières ; un moustique a piqué une fois sur le dos.

La transmission du virus « Uriarra III » a fait l'objet de cinq essais ; celle du virus Loiret 55 de deux essais ; celle du virus Loir-et-Cher d'un essai.

Dans le tableau I qui groupe tous les résultats, le signe + indique que la maladie a été transmise et le signe 0 que les piqûres n'ont pas eu de conséquences objectives. Chacun de ces signes représente un lapin inoculé.

EXPOSÉ ET APPRÉCIATION DES RÉSULTATS.

Virus Uriarra III : Les trois essais de transmission par *A. atroparvus* ont été positifs, les plus longs délais écoulés après le repas infectant ayant été de 2 jours, 11 jours et 21 jours. Des deux essais de transmission par *A. aegypti* l'un a été négatif ; dans l'autre la maladie a été transmise 2 jours et 6 jours après le repas infectant.

Virus Loiret 55 : Les deux essais ont porté sur un nombre plus important de lapins neufs ; la transmission de la maladie a été obtenue trois fois après 3 jours et, dans 7 cas sur 19, après 6 jours.

Virus Loir-et-Cher B : La maladie a été communiquée après 3 jours et après 7 jours.

De l'ensemble de ces essais, il ressort qu'*A. maculipennis atroparvus* est apte à transmettre la myxomatose reconnaissant comme agent un virus atténué du type de ceux que l'on rencontre dans la nature. On remarquera que, dans le septième essai, l'un des lapins infectés après 6 jours n'avait été piqué que par un moustique.

L'examen comparatif du tableau que nous avons publié antérieurement et de celui que nous présentons ici permet de penser que le rôle de ce vecteur actif doit être à peu près le même lorsqu'il est porteur d'un virus atténué que lorsqu'il transporte le virus pleinement pathogène.

Dans l'essai n° 7 (Loiret 55), les 10 lapins qui ont été piqués 3 jours après le repas infectant avaient été inoculés, 3 semaines avant, avec du virus du fibrome de Shope : l'un d'eux a contracté la myxomatose ; les moustiques qui s'étaient gorgés sur ces 10 lapins ont piqué, 3 jours plus tard, 10 lapins neufs ; ils ont communiqué la myxomatose à 5 d'entre eux.

Dans l'essai n° 8 (Loir-et-Cher B), les 8 lapins qui ont été piqués 3 jours après le repas infectant avaient été inoculés, 6 mois avant, avec du virus du fibrome de Shope ; 4 d'entre eux ont contracté la myxomatose, dont 2 ont guéri et 2 sont morts en 25 et 26 jours. Les moustiques qui s'étaient gorgés sur ces 8 lapins ont piqué, 4 jours plus tard, 5 lapins neufs ; l'un a contracté la myxomatose et est mort. Enfin, en même temps que les 8 lapins destinés aux moustiques, 4 autres avaient reçu du virus de Shope ; ils ont été ensuite inoculés par voie hypodermique avec une suspension de virus Uriarra III ; tous ont contracté la myxomatose, l'un est mort en 24 jours, les 3 autres ont guéri.

Ainsi, premièrement, les moustiques chargés de virus atténué du myxome sont aptes à infecter des lapins précédemment inoculés avec du virus de Shope, et, deuxièmement, après s'être

gorgés sur des lapins ainsi traités, ils conservent leur aptitude à infecter des lapins neufs.

Dans l'essai n° 3 (Uriarra III) qui a porté sur 25 lapins neufs, 10 lapins qui étaient restés indifférents aux piqûres de moustiques ont été réinoculés ultérieurement avec le même virus Uriarra III (0,5 cm³ d'une suspension testiculaire au 1/100 sous la peau). Tous ont contracté la myxomatose, mais 3 seulement en sont morts ; les 7 autres ont fait une maladie nodulaire, suivie de guérison. Cette proportion de guéris est élevée, et l'on est fondé à se demander si certains sujets qui se sont montrés résistants au virus d'épreuve n'avaient pas acquis, du fait des piqûres d'insectes, un certain degré d'immunité. Mais l'observation porte sur un trop petit nombre d'animaux pour que la question puisse recevoir une réponse, car les effets des virus atténués sont très irréguliers.

CARACTÈRES DE LA MALADIE TRANSMISE.

Dans ces essais, comme dans ceux antérieurs qui comportaient l'inoculation par des moyens artificiels de virus atténué, nous avons constaté une certaine irrégularité dans les manifestations cliniques et dans la gravité de la maladie ; néanmoins, dans la majorité des cas, le processus différait de la myxomatose classique ou par ses caractères objectifs ou par le rythme de son évolution.

Nous avons réuni dans le tableau II, partie supérieure A, tous les éléments d'appréciation sur ce point. On y verra que la durée d'évolution de la maladie envisagée sur les seuls lapins qui sont morts, a varié, pour le virus Uriarra III, de 12 jours au minimum à 31 jours au maximum, avec une moyenne de 18,7 jours, et pour le virus Loiret 55 de 14 jours au minimum à 27 jours au maximum, avec une moyenne de 21,7 jours.

PASSAGES EN SÉRIE PAR LE MOUSTIQUE.

Nous nous sommes proposé de rechercher si les passages successifs d'un virus atténué par l'organisme du moustique entraîneraient une modification des propriétés pathogènes de ce virus.

Le protocole a été le suivant : des moustiques, en nombre assez important, se gorgeaient sur les lésions d'un lapin inoculé ; 3 jours après, on les mettait en présence de lapins neufs ; lorsque, chez ceux-ci, les lésions de myxomatose étaient bien développées, un autre groupe de moustiques se gorgeait sur eux ; 3 jours après ces moustiques étaient mis en présence de lapins neufs, et ainsi de suite.

TABLEAU II.

A/ EVOLUTION DE LA MYXOMATOSE TRANSMISE PAR LES MOUSTIQUES

Virus employé	Renvoi au Tableau I	Lapins	Nombre & sièges des piqures	Jours écoulés depuis le repas infectant	Incubat.	Evolut.	Total	Type de la maladie
URISEA III	I	257	5 N.O.	2	4	13	17	Subclassique
	II	328	5 N.	3	8	5	13	Subclassique
	-1a-	340	3 N.	11	11	3	14	Classique
	III	46	5 O.P.	2	7	13	20	Classique
	-1a-	48	5 N.O.	2	9	14	23	Mixte
	-1a-	49	7 N.O.	2	10	11	21	Classique
	-1a-	50	8 N.O.	2	6	7	13	Classique
	-1a-	52	7 O.	3	7	21	28	Mixte
	-1a-	51	7 N.O.	3	8	20	28	Mixte
	-1a-	56	4 O.	3	6	54	60	Mixte <u>Guerison</u>
	-1a-	60	8 N.C.	7	7	14	21	Classique
	-1a-	69	10 N.O.	12	6	25	31	Nodulaire
	-1a-	13	6 N.O.	21	18	42	60	Nodulaire <u>Guerison</u>
	V2	347	13 O.	2	5	7	12	Classique
	-1a ²	309	9 O.	6	6	6	12	Subclassique
LOIRET 55	VI	86	5 O.P.	3	7	7	14	Subclassique
	-1a-	91	5 O.	3	7	14	21	Classique
	-1a-	4	5 N.O.	6	6	15	21	Subclassique
	-1a-	6	5 O.P.	6	6	19	25	Classique
	VII	62	4 O.N.	3	7	12	19	Nodulaire
	-1a-	14	4 O.N.	6	5	22	27	Nodulaire
	-1a-	16	4 O.	6	5	20	15	Classique
	-1a-	15	4 O.N.	6	8	15	23	Classique
	-1a-	15	1 O.	6	11	20	31	Nodulaire
	-1a-	18	5 N.	6	7	38	45	Nodulaire <u>Guerison</u>
Loir & Cher B.	VIII	25	50	7	5	13	18	Classique

N. = piqué sur le nez O. = piqué à l'oreille P. = piqué aux paupières

2) Transmission par Aedes aegypti

B/ EVOLUTION DE LA MYXOMATOSE APRES INOCULATION DE BROYATS DE MOUSTIQUES

Virus employé	Essais	Nombre de moustiques	Jours écoulés depuis le repas infectant	Lapins	Incubat.	Evolut.	Total	Type de la maladie
LOIRET 55	1 passage par moust	I	28 ⁴ 16	K. 51 K. 52	8 8	9	17	Classique Sans plus ⁴
	2 passages par moust	II	49 3 3	K. 57 K. 58	8 9	24 36	32 45	Nodulaire Nodulaire - <u>Guerison</u>
		III	47 4 4	K. 89 K. 90	4 4	10 21	14 25	Classique Classique
	3 passages par moust	IV	46 5 5	L. 3 L. 5	9 11	20 12	29 23	Classique Subclassique
	V	44 4 4	L. 11 L. 12	13 10	12 7	25 17	Classique Classique	
SOLORE 55	1 passage par moust	I	35 ³ 8 8	M. 24 M. 25	10 9	10 8	20 17	Mixte Classique
	2 passages par moust	II	35 3 3 3	M. 73 M. 77 M. 84	9 11 11	15 8 12	24 19 23	Mixte Nodulaire Nodulaire
	3 passages par moust	III	35 3 3 3 3	N. 13 N. 14 N. 17 N. 18	9 10 9 9	17 14 11 15	26 24 20 24	Mixte Mixte Mixte Mixte
	4 passages par moust	IV	30 3 3 3 3	N. 49 N. 52 N. 53 N. 54	15 13 8 99	15 14 10 14	30 27 18 23	Mixte Classique Mixte Mixte

4) ont fait 3 repas sur des lapins inoculés de virus du fibrome de Shope 12 jours, 5 jours et 2 jours avant d'être broyés.

3) réinoculé ultérieurement, est resté indifférent.

2) ont fait 1 repas sur des lapins inoculés de virus du fibrome de Shope 4 jours avant d'être broyés.

⁴ ont fait 3 repas sur des lapins inoculés de virus du fibrome de Shope 12 jours, 5 jours et 2 jours avant d'être broyés.³ réinoculé ultérieurement, est resté indifférent.² ont fait 1 repas sur des lapins inoculés de virus du fibrome de Shope 4 jours avant d'être broyés.

TABLEAU III. — Passages en série
par le moustique *A. maculipennis atroparvus*.

Virus employé	Mode d'inoculation	Lapins	Nombre de moustiques qui ont piqué chaque lapin	Incubat.	Evolut.	Total	Type de la maladie	
1014425	Inoculation par piqûres de moustiques							
	1 passage par moustique	K. 14 K. 15 K. 16 K. 20 K. 18	4 1 3 4 5	5 11 5 8 7	22 20 15 15 38	27 31 20 43 45	Nodulaire Nodulaire Nodulaire Classique Nodulaire - Guérison	
	2 passages par moustique	K. 53 K. 54 K. 55	12 11 14	6 7 5	5 11 25	11 18 32	Subclassique Mixte Nodulaire	
	(8 lapins infectés sur 8)	K. 56 K. 67 K. 68 K. 69 K. 70	13 11 12 12 12	5 6 4 7 4	13 12 9 14 15	18 18 13 21 19	Nodulaire Mixte Mixte Subclassique Classique	
	3 passages par moustique	K. 99 K. 100 L. 1 L. 2 L. 7 L. 8 L. 9 L. 10	11 12 11 12 11 11 11 11	4 4 11 17 5 4 4 4	17 21 8 6 12 15 15 17	21 25 12 23 17 19 19 21	Mixte Nodulaire Subclassique Mixte Classique Classique Subclassique Subclassique	
	(8 lapins infectés sur 8)							
	Moyennes du dernier groupe			4,3	15	19,6		
	1014242	<u>AU DÉPART</u>						
		Inoculation expérimentale par voie hypodermique d'une suspension de myxome	M. 18 M. 20 M. 21 M. 22		3 10 9 3	18 10 10 15	21 20 19 18	Subclassique Classique Nodulaire Nodulaire
		Moyennes			6,2	13,2	19,5	
		Inoculation par piqûres de moustiques						
		1 passage par moustique	M. 35	5	5	13	18	Classique
		(1 lapin infecté sur 6)						
		2 passages par moustique	M. 69 M. 70	10 10	6 5	13 14	19 19	Mixte Classique
		(2 lapins infectés sur 4)						
		3 passages par moustique	N. 8 M. 87 M. 88	10 10 9	4 5 6	12 10 11	16 15 17	Classique Classique Classique
		(4 lapins infectés sur 4)						
		4 passages par moustique	N. 45 N. 46 N. 47 N. 48	8 9 6 7	6 3 7 8	13 11 12 11	19 14 19 19	Classique Subclassique Classique Mixte
		(4 lapins infectés sur 4)						
		<u>APRÈS UN PASSAGE PAR LAPIN</u>						
Inoculation expérimentale par voie hypodermique d'une suspension des myxomes N. 47 & N. 48		O. 7 O. 8 O. 9 O. 10 O. 11 O. 12		4 3 4 4 3 4	20 14 14 13 19 11	24 17 16 17 22 15	Classique Classique Classique Classique Mixte Classique	
Moyennes				3,6	15	19		
<u>APRÈS DEUX PASSAGES PAR LAPIN</u>								
Inoculation expérimentale par voie hypodermique d'une suspension des myxomes O. 8 & O. 10		O. 93 O. 94 O. 95 O. 96		4 4 3 4	10 18 22 16	14 22 25 40	Mixte Classique Mixte Nodulaire - Guérison	
Moyennes sur 3 lapins morts				3,66	16,6	20		

Nous avons réalisé ainsi trois passages du virus Loiret 55 par moustique et quatre passages du virus Loir-et-Cher B, en deux expériences distinctes, dont on trouvera les éléments dans le tableau III.

A la lecture de ce tableau, on notera d'abord que dans les deux dernières séries de lapins, dans chaque expérience, celles qui correspondent à l'inoculation par les moustiques de virus ayant passé deux et trois fois (virus Loiret 55) ou trois et quatre fois (virus Loir-et-Cher B) par l'organisme de l'insecte, tous les lapins piqués par les moustiques ont contracté la maladie ; mais ils avaient tous subi de nombreuses piqûres (de 7 à 13) et, en tout état de cause, l'ampleur de l'expérimentation n'a pas été suffisante pour permettre une interprétation valable de cette constatation.

Quant à la gravité et à la forme des manifestations pathologiques, l'examen des résultats ne révèle pas de modifications significatives. Dans la première expérience (virus Loiret 55), après trois passages dans l'organisme du moustique, le virus donne au lapin une maladie dont la durée moyenne est de 19,6 jours. Cette durée est inférieure à celle qui a été obtenue après un seul passage par moustique (tableau II : 21,7 jours), mais elle est la même que celle établie dans nos premiers essais [3] sur le même virus, en dehors de tout passage par l'insecte (19,57 jours).

Les observations faites dans la deuxième expérience (virus Loir-et-Cher B) sont plus instructives à cet égard ; cette expérience comporte, au départ, une épreuve d'appréciation des caractères du virus (inoculation expérimentale à 4 lapins, par voie hypodermique) et, pour finir, l'appréciation du même virus passé quatre fois par l'organisme du moustique ; à ce moment, le virus a été passé deux fois de suite sur le lapin. La durée moyenne d'évolution de la maladie, qui était de 19 jours et demi au départ, a été de 19 jours et de 20 jours dans ces deux derniers groupes de lapins, après les passages successifs par moustique.

Pour compléter l'étude du comportement des virus atténués dans l'organisme du moustique, après chaque passage par l'insecte, lorsque les moustiques considérés comme infectés s'étaient gorgés de sang sur les lapins neufs, on les a broyés au mortier et l'on a inoculé le broyat à des lapins neufs, après dilution en eau physiologique additionnée d'antibiotiques.

On trouvera toutes précisions sur ce point dans la partie inférieure B du tableau II. Les résultats sont en faveur de la stabilité du virus. On remarquera toutefois, qu'après inoculation de broyats de moustiques infectés, la maladie paraît être de plus longue durée, sa prolongation affectant surtout la période d'incubation ; cela peut être dû à ce que, par son action *in situ*, le

support organique constitué par le broyat d'insectes retarde la résorption du virus, ou à ce que ce support enrobe le virus et ne le libère qu'après un certain laps de temps.

RÉSUMÉ.

Les formes de myxomatose reconnaissant comme agent causal les souches atténuées de virus, telles qu'il s'en présente dans la nature (Uriarra III d'Australie, Loiret 55 et Loir-et-Cher B de France) sont transmissibles par piqûres d'*Anopheles maculipennis atroparius* (et d'*Aedes aegypti*).

C'est chez les lapins piqués par les insectes qui s'étaient infectés dans les huit jours précédents que nous avons observé le plus grand nombre d'infectés, mais avec le virus Uriarra III nous avons enregistré des cas de transmission 11, 12 et 21 jours après le repas infectant. Ces résultats ne diffèrent pas beaucoup de ceux que nous avaient donnés les essais de transmission du virus pleinement pathogène. Une seule piqûre de moustique peut provoquer la maladie, mais la transmission est d'autant mieux assurée que le nombre de piqûres est plus grand.

La maladie qui fait suite à l'inoculation par le moustique d'un virus atténué est, par le rythme de son évolution, comme par le caractère de ses manifestations objectives, comparable à celle que détermine l'injection sous-cutanée de ce virus. Néanmoins, à en juger surtout par la proportion des formes atypiques et par la proportion de survivants, l'impression d'ensemble est que la première est un peu plus sévère que la seconde.

Trois et quatre passages successifs de virus atténué par l'organisme du moustique, avec à chaque passage le lapin comme hôte intermédiaire, n'ont pas modifié sensiblement les propriétés pathogènes de ce virus. Sa stabilité dans ces circonstances a été confirmée par l'inoculation au lapin du broyat des moustiques après leur repas sur les lapins neufs d'épreuve.

On est en droit de penser que se trouvent remplies dans nos régions les conditions de propagation des virus atténués du myxome. Il reste à savoir si, comme cela semble s'être produit en plusieurs contrées de l'Australie, ces virus y supplanteront le virus originel, et dans quelle mesure ?

SUMMARY

STUDY OF THE TRANSMISSION TO RABBITS OF ATTENUATED INFECTIOUS MYXOMA STRAINS BY *Anopheles maculipennis atroparius*.

Myxomatosis provoked by attenuated virus strains (Australian and French) may be transmitted by mosquito bites (*Anopheles*

maculipennis atroparvus and *Aedes aegypti*). One bite may cause the disease. Three or four transfers through mosquito do not modify the pathogenic properties of the virus.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] JACOTOT (H.), TOUMANOFF (C.), VALLÉE (A.) et VIRAT (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 477.
- [2] JACOTOT (H.), VALLÉE (A.) et VIRAT (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 8.
- [3] JACOTOT (H.), VALLÉE (A.) et VIRAT (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 361.
- [4] JACOTOT (H.), VALLÉE (A.) et VIRAT (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 779.

LA SENSIBILITÉ DU BACILLE PYOCYANIQUE AUX AGENTS ANTI-BACTÉRIENS D'UTILISATION CLINIQUE

PREMIÈRE PARTIE

par G. ANDRIEU, J. MONNIER et R. BOURSE (*)
(avec l'assistance technique de M^{lle} J. ONFRAY)

(Institut de Bactériologie et d'Hygiène
de la Faculté de Médecine de Toulouse)

La fréquence avec laquelle on isole aujourd'hui dans les examens bactériologiques un bacille pyocyannique et la gravité des affections médicales dont ce germe peut être rendu responsable, ont incité de nombreux auteurs à étudier *in vitro* le comportement de ce germe en face des différents agents antibactériens dont dispose actuellement le clinicien [2, 8, 9, 11, 14, 16, 20, 22].

Nous avons pu recueillir en une année 46 souches de bacille pyocyannique isolées à partir de produits pathologiques divers, et provenant toutes de malades hospitalisés. Il nous a paru intéressant de déterminer sur ces souches d'origine humaine l'action *in vitro* de 21 agents antibactériens différents, antibiotiques, sulfamides et antiseptiques, ainsi que l'activité de certaines associations, réalisées avec les antibiotiques qui se montrent isolément les plus actifs contre l'espèce *Pseudomonas*.

Dans une première partie nous exposerons les résultats de l'étude de la sensibilité des souches aux agents antibactériens isolés, en comparant les différentes méthodes utilisées communément pour sa détermination, et nous essayerons de dégager d'éventuelles corrélations entre le comportement biochimique des souches et leur sensibilité aux antibiotiques.

Nous envisagerons dans une deuxième partie l'activité de certaines associations binaires d'antibiotiques, en la jugeant du double point de vue de l'action bactéricide et des caractères de la résistance acquise des germes soumis à leur action.

(*) Manuscrit reçu le 7 octobre 1956.

**Sensibilité *in vitro* du bacille pyocyanique
aux agents antibactériens isolés.**

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les souches étudiées ont été isolées au Laboratoire central de Bactériologie clinique du Centre Hospitalier Régional de Toulouse (1). Une étude bactériologique préalable [3] nous a conduits à distinguer, à côté de *Ps. aeruginosa* à caractères classiques (34 souches), des variants apyocyanogènes qui se distinguent des précédents par un comportement biochimique un peu différent (12 souches).

TABLEAU I.

PRELEVEMENT	ADULTES	ENFANTS	TOTAL
SUPPURATIONS SUPERFICIELLES			
Plaies	4		4 (9%)
Fractures	3		3 (7%)
Brûlures	2		2 (4%)
Escharre	1		1 (2%)
AUTRES SUPPURATIONS			
Otites	1	1	2 (4%)
Pleurésies	10		10 (22%)
Abcès pelvien	1		1 (2%)
CRACHATS	3		3 (7%)
GORGES	1	13	14 (30%)
URINE	1		1 (2%)
SELLES	2	3	5 (11%)
	29	17	46 (100%)

Les tests de sensibilité aux agents antibactériens ont été réalisés par trois méthodes actuellement bien connues : méthode des dilutions sériées en milieu liquide (dilutions/tube), méthode des dilutions sériées en milieu solide (dilutions/boîte) et méthode de diffusion (méthode des disques).

La sensibilité aux antibiotiques des souches recueillies a été déterminée pour 14 antibiotiques utilisables à ce jour en clinique : pénicilline, streptomycine, néomycine, viomycine, framycétine, auréomy-

(1) Leur origine est rapportée dans le tableau I.

cine, terramycine, tétracycline, chloramphénicol, bacitracine, érythromycine, spiramycine, carbomycine et polymyxine.

La sensibilité aux sulfamides a été déterminée pour deux sulfamides par les méthodes des dilutions (sulfanilamide et sulfafurazol), et pour quatre sulfamides par la méthode des disques ; pour cette dernière épreuve, nous avons utilisé les disques séchés préparés par l'Institut Pasteur avec l'un des quatre sulfamides suivants : sulfanilamide, sulfathiazol, sulfaméthyzol et sulfadiazine. Tous les tests de sensibilité aux sulfamides ont été effectués dans un milieu renfermant 2 p. 100 de globules rouges hémolysés de cheval afin de diminuer l'effet anti-sulfamide des peptones [5].

Nous avons enfin étudié la sensibilité de nos souches à deux anti-septiques, mandélate d'hexaméthylène tétramine et acide borique, mais uniquement par la méthode des dilutions sériées.

L'ensemencement des tubes à hémolyse servant à la détermination de la sensibilité en milieu liquide a été réalisé en ajoutant à 0,5 ml de solution d'antibiotique, 0,5 ml d'une dilution au 1/10 000 d'une culture en bouillon de vingt heures. Nous avons retenu comme contenant la concentration minimum inhibitrice d'antibiotique, le tube ne présentant aucun développement visible après quarante-huit heures d'étuve à 37° C.

Les tests de sensibilité en dilution/boîte ont été effectués par ensemencement linéaire d'une culture pure en bouillon de vingt heures sur une portion de boîte de Petri, de façon à ensemercer chaque fois 12 souches différentes sur la même boîte. Les résultats ont été notés après vingt heures d'étuve à 37°, la C. M. I. retenue correspondant à la première boîte sur laquelle se manifeste une modification appréciable de croissance de la souche envisagée.

Enfin, les disques utilisés dans la méthode de diffusion sont, pour les antibiotiques, des disques préparés extemporanément par une technique dérivée de celle de Spaulding, et couramment pratiquée au Laboratoire de Bactériologie clinique de l'Hôpital de Purpan.

Tous les tests de sensibilité ont été réalisés, pour un agent bactérien donné, simultanément sur 6 souches au minimum. Chaque test a été répété plusieurs fois. Les résultats discordants obtenus avec certaines souches ont été confirmés ou infirmés par ceux que nous ont fournis les autres souches, testées en même temps que les précédentes, et qui auparavant, à plusieurs reprises, avaient donné des résultats comparables. Dans les rares cas où des résultats différents n'ont pu être départagés, nous avons retenu leur moyenne.

RÉSULTATS.

A. — Sensibilité aux antibiotiques.

MÉTHODE DES DISQUES. — Les résultats obtenus par cette méthode ne concernent que trois antibiotiques seulement : terramycine, tétracycline et chloramphénicol. Nous n'avons, en effet, constaté sur aucune de nos souches de zone d'inhibition nette

avec les autres antibiotiques ; mais il faut souligner que la sensibilité à la polymyxine n'a pas été étudiée par cette méthode.

La méthode des disques a ainsi décelé sur les 46 souches étudiées, 26 souches sensibles parmi lesquelles nous avons relevé :

a) 19 souches sensibles à un seul antibiotique (18 à la terramycine et 1 au chloramphénicol) ;

b) 7 souches sensibles à deux antibiotiques (6 à la fois à la terramycine et à la tétracycline, 1 à la fois à la terramycine et au chloramphénicol).

Toutes les souches sensibles à la tétracycline se sont également avérées sensibles à la terramycine.

MÉTHODES DES DILUTIONS SÉRIÉES. — Nous avons représenté, sous la forme de courbes cumulatives, les résultats obtenus avec les méthodes des dilutions sériées (fig. 1 et 2).

La polymyxine B représente *in vitro* l'agent antibactérien le plus actif sur la base pondérale, contre le bacille pyocyanique. Toutes les souches, sauf une, ont leur croissance inhibée en milieu liquide par une concentration de 6,2 µg/ml de cet antibiotique. Les chiffres fournis par la méthode des dilutions/boîte sont un peu plus élevés.

La néomycine et la framycétine ont une activité également assez nette, mais qui se situe à des concentrations plus élevées. La framycétine présente une activité comparable, mais régulièrement inférieure à celle de la néomycine. Les résultats sont surtout très différents suivant le milieu utilisé, l'activité de ces deux antibiotiques paraissant beaucoup plus faible lorsque les tests de sensibilité sont réalisés sur gélose.

Les tétracyclines ont une action légèrement plus faible que les antibiotiques précédents, mais comparable quelle que soit la méthode utilisée. L'auréomycine se distingue cependant de ses deux apparentés chimiques par une activité nettement plus réduite, qui se rapproche beaucoup plus de celle du chloramphénicol et de l'érythromycine.

L'activité de la streptomycine se singularise par une courbe étalée, qui témoigne de sa variabilité suivant la souche étudiée. Dans l'ensemble, on peut considérer que 25 p. 100 environ seulement des souches étudiées sont sensibles *in vitro* à une concentration de 25 µg/ml de cet antibiotique.

Enfin, aucune des souches étudiées n'a été inhibée dans sa croissance par les plus hautes concentrations antibiotiques (800 µg/ml) réalisées avec les antibiotiques suivants : pénicilline, viomycine, bacitracine, spiramycine et carbomycine.

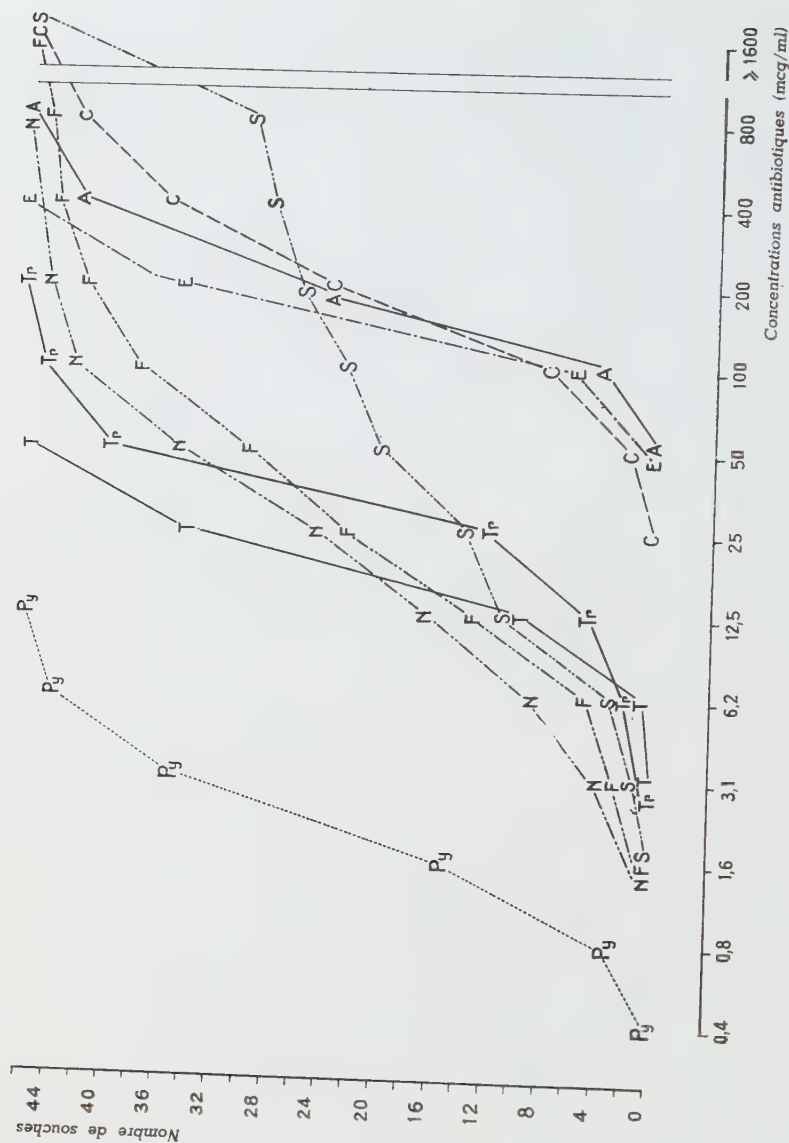


FIG. 1. — Répartition des sensibilités de 46 souches de *Pseudomonas* (Dilutions sériées en milieu liquide).
Détermination de la sensibilité par la méthode des dilutions/tube (C.M.I. après quarante-huit heures d'incubation) : Py : polymyxine — T : terramycine. — Tr : tétracycline. — N : néomycine. — F : framycétine. — E : érythromycine. — S : streptomycine. — A : auréomycine. — C : chloramphénicol.

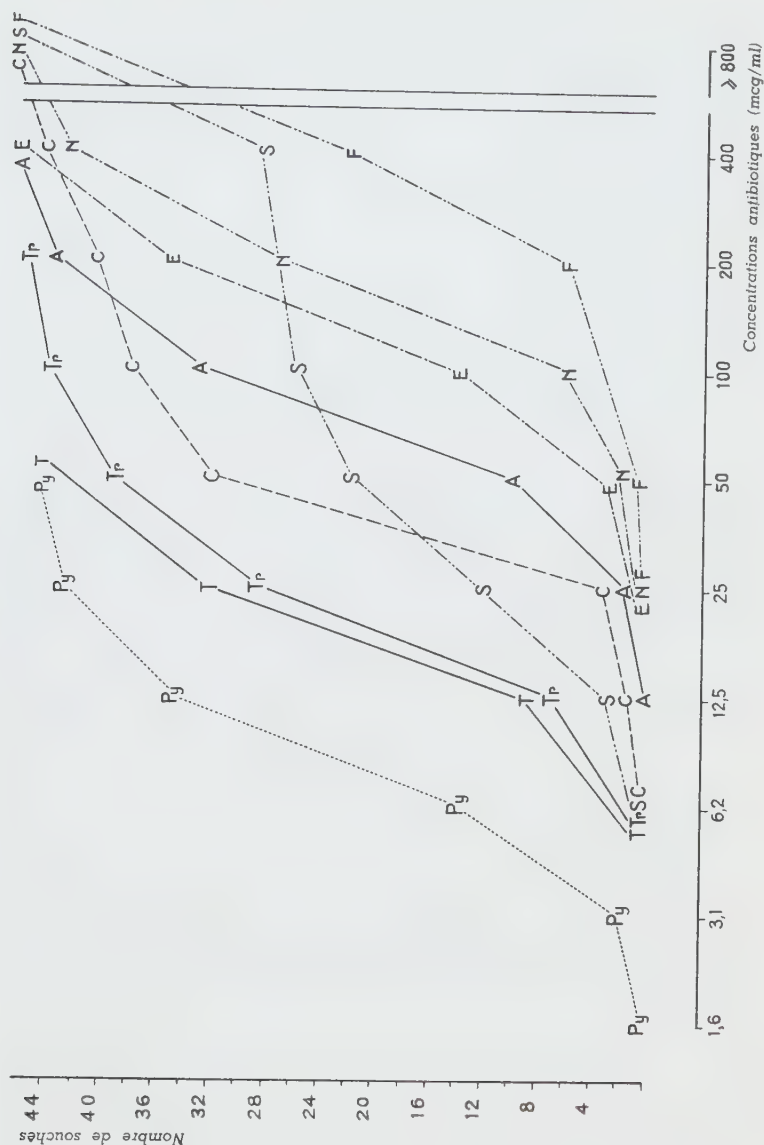


FIG. 2. — Répartition des sensibilités de 46 souches de *Pseudomonas* (Dilutions sériées en milieu solide).

Détermination de la sensibilité par la méthode des dilutions/boîte (C.M.I. après vingt heures d'étuve) : Py : polymyxine. — T : terramycine. — Tr : tétracycline. — N : néomycine. — F : framycétine. — E : érythromycine. — S : streptomycine. — A : auréomycine. — C : chloramphénicol.

B. — *Sensibilité aux sulfamides.*

La détermination de la sensibilité aux sulfamides des souches de bacille pyocyanique que nous avons recueillies nous a donné des résultats assez différents suivant la méthode utilisée.

La méthode des disques objective une activité nette *in vitro* des sulfamides sur *Ps. aeruginosa*. En effet :

91 p. 100 des souches sont sensibles au sulfanilamide ;

80 p. 100 des souches sont sensibles au sulfathiazol ;

57 p. 100 des souches sont sensibles à la sulfadiazine ;

30 p. 100 des souches, enfin, sont sensibles au sulfaméthyzol.

D'autre part, nous avons relevé :

7 souches sensibles seulement à deux ou trois sulfamides ;

3 souches sensibles uniquement au sulfanilamide ;

2 souches enfin totalement insensibles aux quatre sulfamides étudiés.

La méthode des dilutions sériées indique, par contre, des sensibilités beaucoup plus réduites ; aucune des souches n'est inhibée dans sa croissance par 400 µg/ml de sulfanilamide. Le sulfafurazol se montre un peu plus actif, 26 à 50 p. 100 des souches suivant le milieu d'étude, présentant une sensibilité limite à ce sulfamide.

Ces résultats différents s'expliquent probablement par les différences d'importance de l'inoculum suivant la méthode utilisée, les tests en dilutions étant réalisés sur un nombre de germes plus élevé que celui nécessaire à l'ensemencement des tests en diffusion.

C. — *Sensibilité aux antiseptiques.*

L'étude de l'action de deux antiseptiques sur le bacille pyocyanique par la méthode des dilutions sériées montre que, sur la base pondérale, l'activité antibactérienne de ces agents est plus faible que celle des antibiotiques actifs contre ce germe. Toutes nos souches donnent un développement abondant dans les milieux solides ou liquides renfermant une concentration de 400 à 800 µg/ml d'acide borique ou de mandélate d'hexaméthylène-tétramine.

Les exigences d'un traitement local sont cependant bien différentes de celles que demande une thérapeutique par voie générale. Aussi ne doit-on attacher à ces résultats qu'une importance très relative quant à l'activité que les antiseptiques sont capables de posséder *in vivo* contre *Ps. aeruginosa*.

DISCUSSION.

1° Les résultats des tests de sensibilité sont un peu différents suivant la méthode utilisée : la méthode des disques décele en

effet un peu plus de souches sensibles que les tests en dilutions. Ces différences se retrouvent sur le plan qualitatif : la première méthode donne un pourcentage de souches sensibles plus élevé vis-à-vis des tétracyclines et du chloramphénicol, tandis qu'elle ne décèle pas de souches sensibles à la streptomycine, contrairement aux deux dernières.

Ces contradictions ne doivent pas, cependant, à notre avis, être considérées comme absolues. Il faut en effet souligner que la simple variation d'un tube ou d'une boîte, dans deux tests en dilution consécutifs, suffit à faire classer la souche étudiée dans une catégorie de sensibilité différente. Les méthodes des dilutions sériées ont toutefois l'avantage de donner des résultats plus concordants, et surtout de fournir une notion quantitative de l'activité des antibiotiques, notion qui apparaît de plus en plus nécessaire à l'établissement d'une posologie correcte.

2° Les courbes cumulatives (fig. 1 et 2) qui représentent la répartition des souches suivant leur sensibilité à la streptomycine ont une allure assez particulière : elles traduisent une répartition diphasique qui suggère que la distribution des souches suivant leur sensibilité à cet antibiotique n'est pas le fait du simple hasard. Pour essayer de découvrir une cause systématique susceptible d'expliquer cette anomalie de répartition, nous avons rapproché les résultats des tests de sensibilité :

d'une part, du traitement suivi par les malades au moment de l'isolement de la souche infectante ;

d'autre part, du comportement biochimique des souches étudiées, et plus particulièrement de leur aptitude ou non à élaborer de la pyocyanine sur les milieux simples.

Les résultats de ces comparaisons sont illustrés par les diagrammes de la figure 3. Leur examen suggère les déductions suivantes :

a) La sensibilité à la streptomycine des souches isolées de malades ayant reçu un traitement par cet antibiotique est beaucoup plus faible que celle des autres souches. Ceci est en faveur d'une acquisition en clinique de résistance de ces souches à la streptomycine.

b) Il semble exister une corrélation assez nette entre la pigmentogenèse des souches et leur sensibilité à la streptomycine, les souches fortement pigmentées étant globalement sensibles, par opposition aux souches peu ou non productrices de pyocyanine, qui sont insensibles.

c) L'aspect des diagrammes représentant la répartition des souches en fonction du traitement instauré avant l'isolement, semblable à ceux illustrant leur répartition en fonction de la

pigmentogénèse, suggère le rôle inhibiteur que peut jouer la streptomycine sur la production de la pyocyanine.

En somme, tout se passe comme si l'utilisation en clinique de la streptomycine augmentait l'insensibilité du bacille pyocyanique à cet antibiotique *in vitro*, en lui faisant perdre son aptitude à

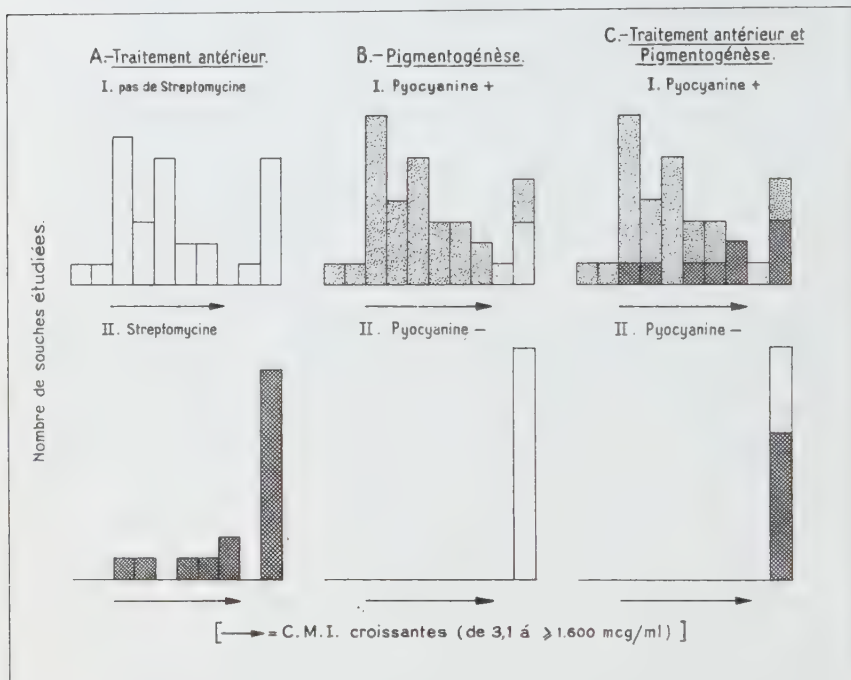


FIG. 3. — Sensibilité de 46 souches de *Pseudomonas* à la streptomycine en fonction du traitement antérieur à l'isolement et de la pigmentogénèse (C.M.I. après quarante-huit heures en milieu liquide). Les diagrammes illustrent la distribution de fréquence des souches étudiées suivant leur sensibilité à la streptomycine : A. Selon que les malades avaient reçu (II) ou non (I) de la streptomycine avant l'isolement. — B. Selon que les souches sont (I) ou non (II) productrices de pyocyanine sur les milieux usuels (en pointillé plus espacé : souches peu productrices de pyocyanine mais très fluorescentes en lumière de Wood). — C. Combinaison des deux diagrammes précédents ; en hachuré : souches productrices (I) ou non (II) de pyocyanine, et isolées de malades en traitement avec la streptomycine.

produire de la pyocyanine. L'explication des faits constatés pourrait également résider dans l'existence de deux races différentes de *Pseudomonas*, mais la sensibilité naturelle de *Ps. fluorescens* à la streptomycine (Waksman) fait perdre beaucoup de valeur à cette dernière hypothèse.

3° Un fait également très intéressant à signaler est la relation qui paraît exister entre la sensibilité des souches à la streptomycine, et leur comportement en présence de néomycine et de framycétine : en effet, en comparant pour chaque souche les résultats des tests en dilution/tube, nous avons remarqué que :

a) Sur les 8 souches insensibles à 100 $\mu\text{g/ml}$ de framycétine, 7 sont également insensibles à 800 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine.

b) Sur les 11 souches insensibles à 50 $\mu\text{g/ml}$ de néomycine, 8 sont également insensibles à 800 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine.

c) Enfin, le total des souches insensibles à la fois à 800 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine, 100 $\mu\text{g/ml}$ de framycétine et 50 $\mu\text{g/ml}$ de néomycine représente 50 p. 100 du total des souches insensibles au premier de ces antibiotiques.

Ces résultats sont d'autant plus remarquables que ni la néomycine, ni la framycétine n'avaient été, à notre connaissance, utilisées avant l'isolement des souches considérées. Il semble y avoir ici un argument de plus en faveur de l'existence possible *in vivo* de résistance croisée entre la streptomycine, la néomycine et la framycétine.

COMPARAISON AVEC LES RÉSULTATS DES TRAVAUX DÉJÀ PUBLIÉS.

Une des études les plus complètes à ce jour sur la sensibilité *in vitro* du bacille pyocyanique aux antibiotiques est celle de Finland et coll. [20] établie sur la sensibilité à 10 antibiotiques de 110 souches récemment isolées. La comparaison des résultats obtenus par ces auteurs avec ceux que nous a donnés la même méthode d'étude montre que les classements des antibiotiques en fonction de leur activité sur le bacille pyocyanique sont sensiblement superposables. Les différences les plus importantes sont enregistrées avec la polymyxine et la néomycine, qui, par cette méthode, donnent sur nos souches des résultats moins bons que ceux obtenus par Finland.

L'étude de Finland permet en outre d'étudier la variation dans le temps de la sensibilité des souches. C'est ainsi qu'entre les résultats obtenus en 1948 [8] et ceux enregistrés en 1954, les auteurs notent un déphasage des courbes cumulatives exprimant la répartition des souches suivant leur sensibilité à la streptomycine et au chloramphénicol, qui témoigne d'une diminution de la sensibilité des souches à ces deux antibiotiques. Il est également intéressant de remarquer l'allure particulière des courbes de répartition des sensibilités à la streptomycine, phénomène qui se retrouve dans les deux périodes, et qui est analogue à celui qu'il nous a été donné d'observer dans l'étude de nos souches.

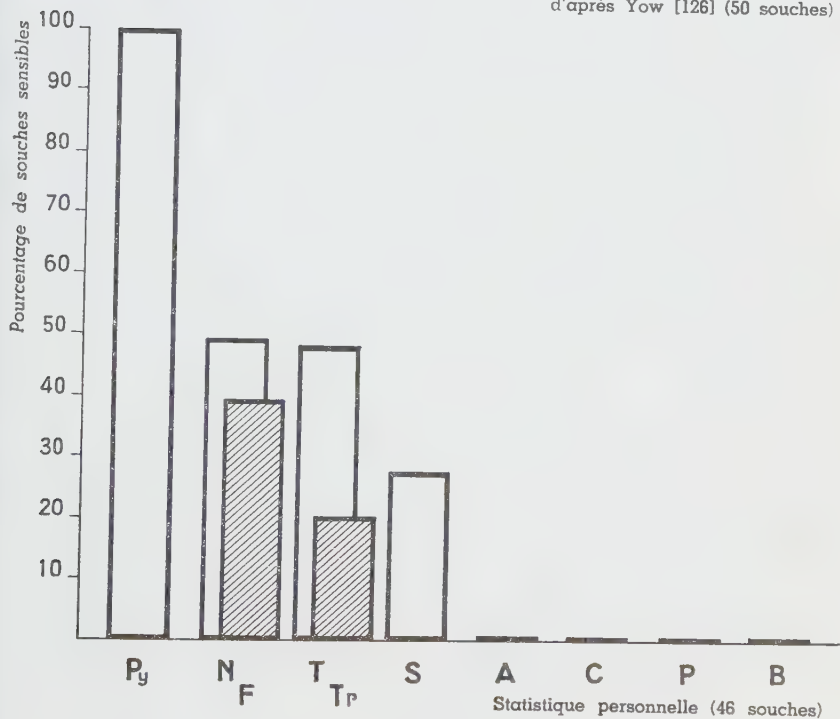
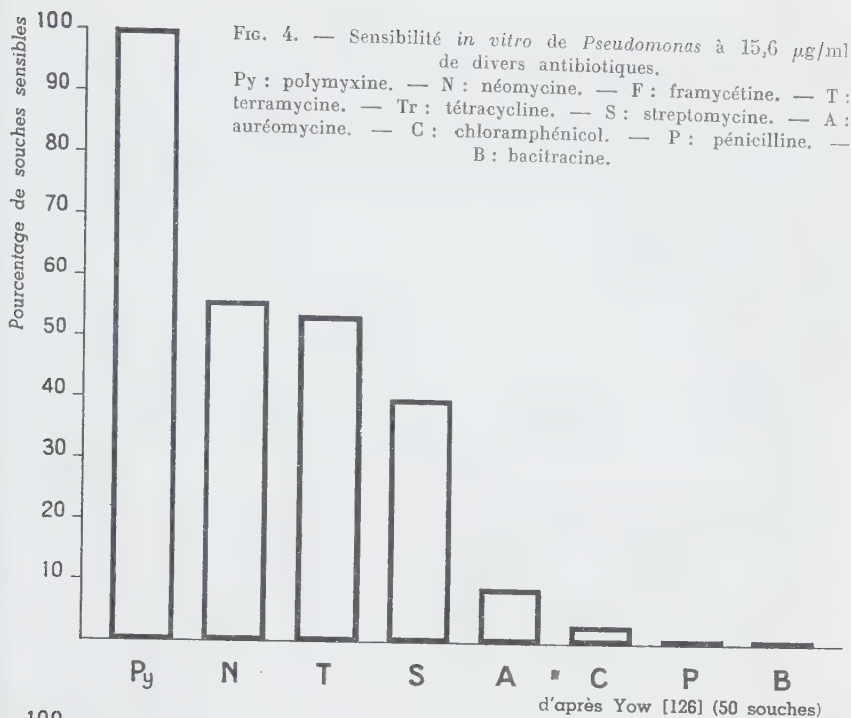
Finland note enfin une augmentation de l'insensibilité des sou-

ches à la néomycine et à la tétracycline, et cela bien que ces antibiotiques n'aient pas été utilisés en thérapeutique durant la période considérée. Ce fait est interprété par l'auteur comme le témoignage de la résistance croisée entre streptomycine et néomycine d'une part, entre auréomycine et tétracycline d'autre part. Ces phénomènes de résistance croisée sont actuellement bien connus et se retrouvent dans l'étude de très nombreux germes entre certains antibiotiques, de sorte que l'on peut proposer une classification des antibiotiques sur cette base [15]. Nous les avons retrouvés pour le bacille pyocyanique entre la streptomycine, la néomycine et la framycétine.

Une autre étude d'ensemble particulièrement intéressante a été réalisée par Yow et Townsend [22]. Ces auteurs ont évalué la sensibilité de 50 à 100 souches différentes de bacille pyocyanique à 8 antibiotiques, en comparant les résultats fournis par la méthode des disques à ceux donnés par la méthode des dilutions/tube. Ils trouvent que les deux méthodes donnent des résultats assez voisins, mais toutefois moins bons avec le chloramphénicol et la terramycine, la méthode des disques ayant tendance à accorder une sensibilité exagérée des souches à ces antibiotiques.

Dans une publication antérieure, Yow [21] illustre les résultats obtenus par la méthode des dilutions/tube avec 50 souches de *Ps. aeruginosa*, au moyen d'un diagramme exprimant le pourcentage des souches sensibles à chaque antibiotique étudié, le taux de sensibilité étant uniformément fixé à 15,6 $\mu\text{g/ml}$. Nous avons établi sur les mêmes bases un diagramme illustrant la sensibilité de nos souches. Le chiffre de 15,6 $\mu\text{g/ml}$ ne correspondant à aucun de nos taux de dilution, nous avons calculé ce pourcentage en établissant la moyenne des souches sensibles à 12,5 $\mu\text{g/ml}$ et à 25 $\mu\text{g/ml}$. La comparaison des deux diagrammes (fig. 4) souligne leurs similitudes dans le classement des antibiotiques suivant leur activité, comme dans le pourcentage de souches sensibles. Nous avons de plus représenté sur notre diagramme le pourcentage des souches sensibles respectivement à la framycétine et à la tétracycline. Ces antibiotiques témoignent ainsi d'une activité voisine mais légèrement inférieure à celle de leurs apparentés biologiques ou chimiques, néomycine d'une part, terramycine d'autre part.

Il est également intéressant d'établir une comparaison entre les résultats de Yow et ceux de Finland. Ces auteurs, par des méthodes un peu différentes, aboutissent à des résultats identiques, sauf en ce qui concerne la néomycine, que Finland place à un rang bien inférieur à celui que lui accorde Yow. Ce fait peut s'expliquer par une évolution générale des souches dans le sens d'une insensibilité à cet antibiotique, mais nous paraît plutôt résulter de



conditions différentes dans la technique choisie, comme l'importance de l'inoculum ou même la nature du milieu utilisé. En nous appuyant sur nos résultats, c'est cette dernière hypothèse qui nous paraît la plus vraisemblable, hypothèse que semblent également soutenir Clancy [7] ainsi que Waksman et Lechevalier.

La publication de Lutz et coll. [41] étudie la sensibilité de 115 souches de bacille pyocyanique à la framycétine, en comparant l'action de cet antibiotique à celle de la terramycine et de la polymyxine ; la framycétine se montre capable d'inhiber 85 p. 100 des souches étudiées à une concentration de 15 $\mu\text{g/ml}$, la même concentration de polymyxine inhibant 100 p. 100 des souches alors que la terramycine dans les mêmes conditions n'en inhibe que 68 p. 100. Nos résultats, obtenus avec la même méthode, mais avec un ensemencement un peu plus riche, confirment la sensibilité du bacille pyocyanique à la framycétine, bien que cet agent nous ait paru légèrement moins actif que la terramycine. D'autre part, 20 p. 100 de nos souches ne sont sensibles qu'à des concentrations en framycétine de 50 $\mu\text{g/ml}$ ou plus, alors qu'aucune des souches de Lutz ne pousse dans une concentration en antibiotique supérieure à 40 $\mu\text{g/ml}$.

L'étude de la sensibilité *in vitro* du bacille pyocyanique aux sulfamides a fait l'objet, à notre connaissance, de beaucoup moins de travaux. Nous n'avons relevé comme étude d'ensemble que la publication de Mollaret et Warluzel [44, 49] rapportant les résultats de la détermination de la sensibilité aux sulfamides de 53 souches de bacille pyocyanique par la méthode des disques. Ces résultats sont assez étroitement confirmés par l'étude de nos souches réalisée par la même méthode. Ceci souligne la valeur de la méthode employée, et traduit une activité intéressante *in vitro* des sulfamides vis-à-vis de *Ps. aeruginosa*.

Les résultats obtenus par d'autres auteurs avec la méthode des dilutions sériées sont beaucoup moins encourageants, mais également plus variables, et parfois même discordants. Ainsi, Ciaudo [6] trouve une activité nette de la sulfadiazine qui inhibe la croissance de 5 souches à une concentration inférieure à 20 $\mu\text{g/ml}$. Au contraire, Schweinburg et Rutenburg [47], par une méthode similaire, aboutissent à des résultats opposés, les 4 souches étudiées par les auteurs exigeant 10 000 $\mu\text{g/ml}$ et plus pour être inhibées dans leur croissance par le même sulfamide.

Ces contradictions tiennent vraisemblablement au fait que de multiples facteurs influent *in vitro* sur l'activité des sulfamides, comme la nature du milieu, la présence éventuelle de produits anti-sulfamides, l'importance et l'âge de l'inoculum. Il semble donc que, en ce qui concerne la sensibilité du bacille pyocyanique aux sulfamides, les résultats fournis par les tests en dilutions

soient trop peu concordants pour constituer une indication valable de leur utilisation clinique. Il faut donner la préférence dans ce cas à la méthode des disques, dont les résultats paraissent nettement plus reproductibles.

De même que pour l'étude des sulfamides, peu de travaux, à notre connaissance, ont été consacrés à l'étude *in vitro* de la sensibilité de *Pseudomonas* aux antiseptiques. La publication de Bertoye et Courtieu [2] est la plus complète que nous ayons relevée. Elle rapporte une méthode intéressante d'appréciation du pouvoir bactéricide de nombreux antiseptiques de nature chimique différente. Elle montre que *Ps. aeruginosa* demeure *in vitro* très sensible à l'action bactéricide de la grande majorité des antiseptiques étudiés (2).

(2) Le résumé et la bibliographie paraîtront avec la seconde partie

RAPPORTS ENTRE L'ACTIVITÉ CATALASIQUE, LA RÉSISTANCE A L'ISONIAZIDE ET LE POUVOIR PATHOGÈNE DES SOUCHES ISONIAZIDO-RÉSISTANTES (*)

par B. KREIS et E. LE JOUBIOUX (**) (***).

(Clinique de la Tuberculose de la Faculté de Médecine de Paris
[professeur Etienne BERNARD])

La technique semi-quantitative de mesure de l'activité catalasique que nous avons décrite antérieurement [1] nous a permis d'étudier avec plus de précision les rapports de l'activité catalasique avec la résistance à l'isoniazide et avec le pouvoir pathogène que nous avons déjà abordés précédemment [2].

Rappelons que cette technique ne constitue qu'un dosage approximatif de l'activité catalasique. Toutefois, une étude comparative à l'appareil de Warburg nous a montré que notre méthode permettait au moins de répartir les souches en trois groupes : taux de décomposition de l'eau oxygénée normal (60 à 100 p. 100), faible (20 à 50 p. 100), nul (0 à 10 p. 100). C'est à ces pourcentages que nous nous référerons quand nous parlerons, par simplification, de teneur normale, faible, ou nulle en catalase. On verra par la suite qu'il serait sans doute préférable de considérer que le taux de décomposition normal doit atteindre au moins 80 p. 100.

RAPPORTS ENTRE L'ACTIVITÉ CATALASIQUE ET LA RÉSISTANCE A L'ISONIAZIDE.

Notre étude porte à ce jour sur 937 souches, isolées chez nos malades. Le tableau I établit ce fait fondamental que 98 p. 100 des 556 souches sensibles (à 0,1 µg/ml) avaient une teneur nor-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 octobre 1956.

(**) Aide technique : M^{lle} S. Fournaud.

(***) Travail réalisé avec l'aide de l'Institut National d'Hygiène (professeur Bugnard) et de la Caisse Nationale de Sécurité Sociale.

male en catalase. Inversement, l'absence d'activité catalasique n'a été rencontrée que dans les souches résistantes. Elle s'y montre d'autant plus fréquente que la résistance est plus élevée. Nous ne l'avons constatée dans aucune des 55 souches résistantes à 0,1 mg et sensibles à 1 μ g ; elle s'observe dans 10 p. 100 des 109 souches résistantes à 1 μ g et sensibles à 5 ; dans 25 p. 100 des 47 souches résistantes à 5 μ g et sensibles à 20. Sur les 170 souches résistantes à plus de 20 μ g, 82 p. 100 sont dépourvues d'activité catalasique.

TABLEAU I. — Rapports entre la résistance et l'activité catalasique (en pourcentage de H_2O_2 décomposé).

Pourcentage de H_2O_2 décomposé en 1" à 4°C	Activité catalasique	Résistance à l'isoniazide									
		Sensibles R(0,1		0,1(R(1		1(R(5		5(R(20		R > 20	
		Nombre de Souches	%	Nombre de Souches	%	Nombre de Souches	%	Nombre de Souches	%	Nombre de Souches	%
100	Normale	280		13		15		3			
90		140		17		8		3		3	
80		50	98:	7	87:	10	59:	2	28:		5:
70		55		7		14		2		1	
60		10		4		13		3		4	
50	Faible	5		3		15		2		3	
40		7	2:	3	13:	12	31:	9	47:	3	13:
30				1		6		6		10	
20						1		5		6	
10	Nulle					7					
0						4	10:		25:		82:
Total des Souches 937		556		55		109		47		170	

Les chiffres indiquent le nombre de souches par série

Ces chiffres ne fixent pas de façon tout à fait exacte les rapports de la résistance et de l'activité catalasique, parce qu'il s'agit en général de populations bacillaires directement isolées chez le malade et dont l'homogénéité n'a pas été contrôlée. La présence de catalase dans les souches résistantes peut être le fait d'une petite proportion de germes sensibles qui s'y trouvent mêlés. Néanmoins, nos pourcentages présentent un certain intérêt pour le clinicien qui veut connaître la probabilité, pour une souche de résistance donnée, d'être dépourvue d'activité catalasique.

Il faut noter que la résistance de ces germes a été déterminée en milieu de Youmans, avec un inoculum de 0,01 mg de bacilles, après lecture au huitième jour. Cette technique met en valeur les germes les plus résistants, mais tend à surestimer la résistance moyenne de la population microbienne. On devra en tenir compte en comparant notre statistique à celle d'autres auteurs.

RAPPORTS ENTRE L'ACTIVITÉ CATALASIQUE
ET LE POUVOIR PATHOGENE.

L'intérêt qu'a suscité l'étude de l'activité catalasique des bacilles tuberculeux est surtout fonction des relations qu'elle présente avec le pouvoir pathogène de ces bacilles.

Nous avons rapporté ailleurs les résultats de nos inoculations au cobaye, à la souris, au mériion, au porc et au singe [2, 3]. Celles-ci ne comportaient pas toutes une détermination de l'activité catalasique. A l'heure actuelle nous avons inoculé à la dose de 0,1 mg, par voie sous-cutanée au cobaye, 177 souches qui ont été soumises au test qualitatif de Middlebrook [4], permettant de séparer souches catalase négatives et catalase positives. Quarante-cinq de ces souches étaient sensibles (à 0,1 µg de INH) et catalase positives ; toutes ont provoqué une tuberculose progressive ; dans 3 cas, cependant, les lésions au quatre-vingt-dixième jour étaient peu importantes et la mort des cobayes très tardive

TABEAU II. — Pouvoir pathogène en fonction de la catalase.

Souches catalase positives

Lésions au 90 ^e jour	Nombre de souches	0,1 < R < 1	1 < R < 5	5 < R < 20	R > 20
Importantes et étendues	28	6	11	1	10
Purement locales	13	2	3	1	7
Total	41	8	14	2	17

Souches catalase négatives

Lésions au 90 ^e jour	Nombre de souches	0,1 < R < 1	1 < R < 5	5 < R < 20	R > 20
Importantes et étendues	8	1	1	0	6
Purement locales	83	4	7	4	68
Total	91	5	8	4	74

(1 cobaye survivait au deux cent vingtième jour avec des lésions assez étendues). Les 132 souches restantes étaient résistantes, dont 41 catalase positives. Parmi ces dernières, 28 ont provoqué la mort des cobayes ou des lésions étendues au quatre-vingt-dixième jour, et 13 des lésions locales seulement. Sur les 91 souches catalase négatives, 8 ont donné des lésions étendues et 83 des lésions purement locales (tableau II).

Mais, là encore, si ces chiffres, comme d'autres déjà publiés, ont de l'intérêt pour le clinicien, ils ne permettent pas une vue exacte des relations entre le pouvoir pathogène et la catalase. L'hétérogénéité possible des souches fait que des germes sensibles en petit nombre peuvent fausser l'étude du pouvoir pathogène. Le sacrifice des cobayes au quatre-vingt-dixième jour donne une notion insuffisante du pouvoir pathogène, car il peut faire méconnaître aussi bien des tuberculoses lentement progressives ayant donné encore peu de lésions au quatre-vingt-dixième jour, que des tuberculoses complètement régressives, mais dont les lésions au quatre-vingt-dixième jour ont été plus étendues qu'il n'est de règle. Enfin, l'absence de mesure quantitative de l'activité catalasique conduit, sur la foi de la réaction de Middlebrook, à grouper des souches d'activité très réduite avec des souches normales.

Aussi ne retenons-nous qu'un groupe de 60 souches résistantes répondant aux exigences suivantes :

1° Trois cobayes ont été inoculés par souche, l'un sacrifié au quatre-vingt-dixième jour et l'un au moins des deux autres, s'il s'agit de souches peu pathogènes, a été conservé de deux cents à trois cent soixante-cinq jours.

2° L'activité catalasique et la résistance ont été mesurées avant l'inoculation, et dans les cultures de la rate et des ganglions trachéo-bronchiques de tous les animaux quand ces cultures ont été positives.

3° On a éliminé les cas où sont apparus chez les animaux des bacilles sensibles dont l'activité catalasique s'était fortement modifiée, même si cela s'était produit après le deux centième jour seulement.

Le pouvoir pathogène est considéré comme différent de celui des bacilles tuberculeux normaux si l'animal ne meurt pas de tuberculose, si les lésions au quatre-vingt-dixième jour sont légères et presque uniquement locales et si les lésions après six mois sont nulles ou moins importantes qu'au quatre-vingt-dixième jour. Ce type spécial de pouvoir pathogène n'a été observé pour aucune des 45 souches sensibles, d'activité catalasique normale, que nous avons étudiées. Au contraire, il caractérisait 38 des 39 souches dépourvues d'activité catalasique ; 9 des 13 souches d'activité

catalasique faible ; 2 des 10 souches résistantes d'activité catalasique voisine de la normale (70 p. 100) [tableau III].

TABLEAU III.

	Activité Catalasique			
	60 à 100 %		20 à 50 %	0 à 10 %
	Sensibles	Résistantes		
Tuberculose progressive	45	6	4	1
Tuberculose régressive	0	2	9	38
Nombre de souches	45	8	13	39
Rapports de l'activité catalasique et du pouvoir pathogène pour le cobaye des souches résistantes homogènes				

Si la fréquence des souches pathogènes paraît croître avec le taux de catalase, le degré de l'activité pathogène des souches n'est nullement proportionnel à leur richesse en catalase. On observe en réalité deux variétés de pouvoir pathogène : la variété classique, qui se manifeste par une tuberculose progressive et mortelle, est observée toutes les fois que la souche présente une activité catalasique normale ; l'autre variété détermine une tuberculose discrète et régressive, et on la constate quand les populations bacillaires sont d'activité catalasique faible ou nulle (1).

Les souches de taux catalasique intermédiaire présentent l'un ou l'autre de ces types de pouvoir pathogène, sans que leur taux de catalase permette de le prévoir. Cette variabilité tient peut-être à l'imperfection de nos techniques de dosage, rapprochant à tort quelques souches inégalement riches en catalase. Mais elle nous paraît surtout due à l'hétérogénéité des souches, qui groupent, comme nous l'avons vu [4], sous un même taux catalasique global, des populations bacillaires de composition très dissemblable.

(1) Le pouvoir pathogène de ces mutants dépourvus de catalase est assez particulier pour qu'ils nous semblent mériter de constituer un sous-groupe particulier de *Myc. tuberculosis* var. *hominis*.

INTERPRÉTATION DES FAITS.

Les souches pauvres en catalase sont capables de créer des lésions locales d'importance variable, liées à la toxicité des corps bacillaires ; mais elles ont perdu le pouvoir de se multiplier indéfiniment en créant des lésions multiples à distance, qui est l'apanage des souches mieux pourvues de catalase. Il est tentant de penser que l'extension prématurément arrêtée des lésions, puis leur régression, sont dues au blocage ou à l'épuisement, dans ces lésions, des apports catalasiques exogènes, nécessaires, comme l'a montré Middlebrook, à la reproduction des bacilles qui sont dépourvus de catalase endogène. Là où viennent à manquer, soit la catalase, soit les substances susceptibles de la remplacer que le milieu extérieur fournit aux bacilles, la multiplication des germes et la progression des lésions cessent. Ces bacilles peuvent demeurer longtemps vivants dans le caséum, mais non dans les tissus actifs où la phagocytose et peut-être la formation de H_2O_2 les tuent rapidement. On s'expliquerait ainsi le comportement différent des bacilles dépourvus de catalase dans des lésions de type et de richesse catalasique divers : prolifération dans les cavernes, persistance dans les ganglions caséeux, disparition des viscères.

SUMMARY

RELATIONSHIPS BETWEEN CATALASE-ACTIVITY,
INH-RESISTANCE AND PATHOGENICITY OF INH-RESISTANT STRAINS.

556 strains out of 937 isolated from invalids were sensitive to 0,1 $\mu\text{g/ml}$ INH and possessed a catalase activity. Among the 381 resistant strains, the number of strains deprived of catalase increases with the resistance.

Statistical analysis of the pathogenicity of resistant strains are valid only for homogeneous strains controlled by the study of the germs found in the guinea-pig three months or more than 6 months after inoculation. 60 of the 132 resistant strains inoculated corresponded to this definition. All those possessing a marked catalase activity were pathogenic, but this pathogenicity is not proportional to the degree of catalase activity.

All the catalase-negative strains have a special pathogenicity, characterized by the persistence of a local lesional activity and the regressive evolution of distant lesions. This last character may be in relation with the absence of catalase.

When the catalase activity is low, certain strains manifest a

normal pathogenicity, others the same pathogenic pattern as catalase negative strains.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] KREIS (B.), LE JOUBIOUX (E.) et PARIENTE (D.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956.
- [2] BERNARD (E.), KREIS (B.) et LE JOUBIOUX (E.). *Rev. Tub.*, 1955, **49**, 1113.
- [3] BERNARD (E.), KREIS (B.), THIÉRY (J.) et LE JOUBIOUX (E.). *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1955, **139**, 462.
- [4] MIDDLEBROOK (G.). *Am. Rev. Tub.*, 1954, **69**, 471.

LES GRANULES DES MYCOBACTÉRIES ET LE SIÈGE DE L'ACIDO-RÉSISTANCE DANS LEURS CELLULES

par GEORGES KNAYSI (*)

(*Cornell University, Ithaca, N. Y., U.S.A.*)

Lorsqu'on colore des Mycobactéries par la méthode de Ziehl, les cellules de cultures jeunes se colorent uniformément, tandis que les cellules de cultures qui ont déjà atteint la maturité présentent d'habitude un certain nombre de granules qui leur donnent souvent une apparence de chapelets. Dans ces granules l'acido-résistance est plus forte que dans le reste du corps bacillaire. On les considère en général comme des corps réels, se formant après la période de croissance rapide. Cependant, depuis les observations de Yegian et ses collaborateurs [7, 8] et de Lamanna [6] sur le bacille tuberculeux, on tend à les prendre pour des artefacts. D'après Lamanna, en effet, les granules sont dus à la séparation du phénol et du colorant sous l'influence du lavage à l'eau. D'après Yegian et Vanderlinde, les granules ne représenteraient que des précipités de colorant libre. Cependant, les observations de Knaysi, Hillier et Fabricant [5] au microscope électronique, et de Knaysi [3] au microscope à contraste de phase, ont définitivement démontré l'existence, dans les Mycobactéries, de corps denses qui pourraient bien correspondre aux granules observés par la méthode de Ziehl. Il est possible de démontrer que ces corps denses sont des noyaux composés [4], c'est-à-dire des corps nucléaires de volume variable formés par l'association, sans fusionnement de chromatine, de corps nucléaires plus élémentaires appelés noyaux primaires (Voir pl. II, fig. 6). Comme le cytoplasme des Mycobactéries contient un certain nombre de vacuoles, la dessiccation produirait une réduction énorme d'épaisseur dans les régions cellulaires purement cytoplasmiques. Dans les régions qui contiennent un corps dense, la diminution d'épaisseur est moins prononcée, de sorte qu'une cellule desséchée présenterait un relief bien mouvementé. Ceci a été mis en évidence par la méthode de l'ombrage [5].

(*) Manuscrit reçu le 27 octobre 1956.

L'élaboration d'une méthode qui facilite l'observation des mêmes cellules après différents traitements consécutifs [4] nous a permis de déterminer si les granules qu'on voit par la méthode de Ziehl sont identiques à ceux qu'on observe par d'autres méthodes. Pour cette méthode on se sert de microcultures sur collodion [4]. La gélose est découpée autour de la microculture et l'on fait flotter le collodion qui supporte la culture sur de l'eau distillée. Le collodion est alors enlevé sur une lamelle. On laisse sécher après avoir prélevé l'excès d'eau avec du papier buvard, et l'on repère la microculture par des axes de coordonnées tracés

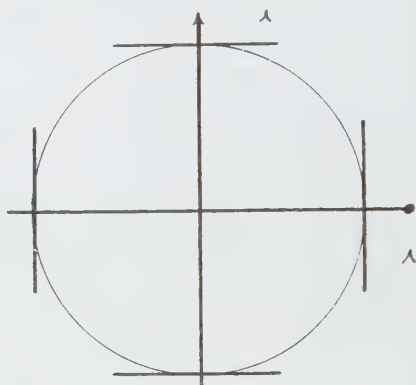


FIG. 1. — Schéma d'une microculture repérée par des axes de coordonnées. Le petit cercle plein à droite, au bout de l'axe principal d'abscisses, et les flèches servent à orienter la préparation et à indiquer le côté de la lamelle où se trouve la microculture.

avec un crayon doux à pointe fine (fig. 1). On soumet alors la microculture aux traitements consécutifs désirés, observant les mêmes cellules après chaque traitement. Lorsque deux traitements consécutifs exigent qu'on nettoie la lamelle d'huile, de paraffine, ou de vaspar (un mélange de volumes égaux de vaseline et de paraffine), on tient la lamelle avec une pince dans un courant d'eau chaude (dont la température dépasse le point de fusion de la paraffine), puis on fait absorber l'excès d'eau libre, autour de la microculture, par un papier buvard et l'on agite dans un flacon d'alcool à 96 p. 100. On laisse ensuite égoutter l'excès d'alcool, on immerge quelques instants la lamelle dans un flacon de xylol, puis on retourne à l'alcool et l'on rince à l'eau chaude.

La méthode de Ziehl-Neelsen a été appliquée de la manière suivante : la lamelle qui porte la microculture est placée sur une

boîte de Petri, ou un support semblable, et est couverte de colorant. Le chauffage est fait d'en haut en dirigeant la flamme d'un bec Bunsen sur le colorant trois fois, chaque fois durant plusieurs secondes. On décolore avec de l'acide chlorhydrique décinormal dans l'alcool à 96 p. 100.

Nous nous sommes servi exclusivement d'une Mycobactérie saprophyte, *Mycobacterium thamnopheos*, qui a, sur les espèces pathogènes, l'avantage de pouvoir croître sur les milieux usuels avec une rapidité convenable. Les résultats typiques de nombreuses observations faites sur des microcultures ainsi préparées sont reproduits sur les fig. 2 à 5, pl. I et II. On constate que les mêmes granules, visibles dans les cellules colorées par le Ziehl, se voient dans des cellules fixées pendant une ou deux minutes par le formol gazeux, sans coloration (fig. 2) ou après montage dans une solution de thionine ou de bleu de méthylène (fig. 3 à 5). De plus, les figures 3 à 5 confirment ce que nous avons rapporté en 1929 [2] à savoir : que les structures cellulaires les plus acido-résistantes sont, en ordre décroissant, ces mêmes granules et la membrane cytoplasmique. Il est probable qu'à l'intérieur du cytoplasme la concentration de la matière acido-résistante est plus faible qu'à la surface (membrane cytoplasmique), mais l'intensité de la coloration du cytoplasme est encore réduite par la présence, dans le cytoplasme, de vacuoles incolores. Les noyaux primaires aussi sont acido-résistants et, dans des conditions favorables, peuvent être rendus visibles au sein du cytoplasme par la méthode de Ziehl-Neelsen (fig. 5 a et 6, pl. II).

On pourrait se demander pourquoi nous avons appelé les lignes périphériques de la figure 4 membranes cytoplasmiques et non parois cellulaires. La raison en est que les structures que l'on peut identifier avec certitude comme parois cellulaires proprement dites, comme celles que la dessiccation fait apparaître aux extrémités de certaines cellules, ne sont pas visibles dans les préparations colorées par la méthode de Ziehl-Neelsen (*Cf.* fig. 3, pl. I, cellules a à e).

Finalement, malgré la ressemblance presque parfaite entre les granules nucléaires (noyaux composés) de *Mycobacterium thamnopheos* et les granules rendus visibles par la méthode de Ziehl-Neelsen, nous n'écartons pas la possibilité d'une formation de granules artificiels dans certaines conditions. Sans doute, la structure cytoplasmique des Mycobactéries est rendue délicate par les vacuoles qui peuvent occuper une proportion considérable de la cavité protoplasmique et, dans une publication ultérieure, nous espérons montrer les formations artificielles que certaines méthodes cytologiques peuvent causer dans les cellules des Mycobactéries.

CONCLUSIONS.

Des observations faites sur les mêmes cellules de *Mycobacterium thamnophaeos* traitées consécutivement de manières différentes permettent de conclure que les granules mis en évidence dans les cultures bien développées par la méthode de Ziehl-Neelsen ne sont pas des formations artificielles mais représentent surtout des noyaux composés. Ces noyaux, et à un degré moindre la membrane cytoplasmique, sont les structures les plus acido-résistantes du *Mycobacterium*. Les noyaux primaires aussi sont encore plus acido-résistants que le cytoplasme. La coloration de ce dernier est, en partie, rendue faible par la présence, en son sein, de vacuoles incolores. Une méthode pour étudier les mêmes cellules après divers traitements consécutifs est décrite.

SUMMARY

THE GRANULES OF MYCOBACTERIA AND THE LOCALIZATION OF ACID-RESISTANCE.

Observations made on the same cells of *Mycobacterium thamnophaeos* treated consecutively in various manners show that the granules demonstrable in mature cultures by the Ziehl-Neelsen method are not artifacts but are compound nuclei. These nuclei and the cytoplasmic membrane are the most acidfast. The primary nuclei are also more acidfast than the cytoplasm. The color of the latter

PLANCHE I

FIG. 2 A (56-I, 28). — Une microculture sur collodion supporté par un milieu solide composé d'infusion de bœuf et de 1 g de tryptone, 1 g de glucose, 0,05 g de néotétrazolium, et 2 g de gélose par litre d'infusion. Age 24 h à 30° C. Après dessiccation la culture fut fixée pendant 2 mn par du formol gazeux et observée, sans coloration, avec le microscope à contraste de phase. Le néotétrazolium fut ajouté pour augmenter le contraste.

FIG. 2 B (56-I, 33). — Les mêmes cellules de la microculture de A après coloration par la méthode de Ziehl-Neelsen.

FIG. 3 A (54-L, 15). — Une microculture sur collodion supporté par le milieu solide de la figure 2, mais sans néotétrazolium, Age 7 h à 30° C. La microculture desséchée fut fixée par le formol gazeux, montée dans une solution de thionine acidifiée par HCl (0,1 ml de HCl décimormal par 10 ml de solution) contenant 1 g de thionine par litre. Cf. [4]. Observée sur fond clair ordinaire.

FIG. 3 B (54-L, 23). — Les mêmes cellules de A après coloration par la méthode de Ziehl Neelsen.

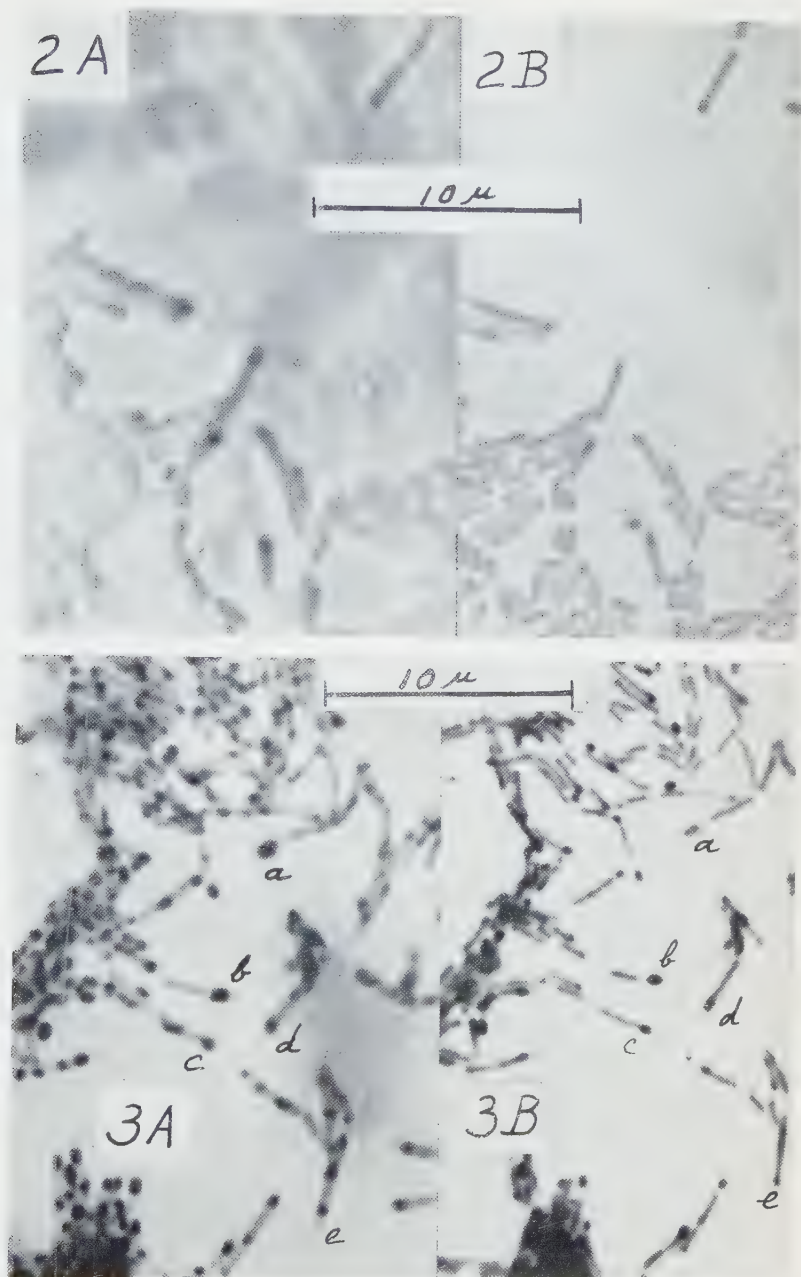


PLANCHE I.

PLANCHE II

FIG. 4 (55-E, 7 et 9). — Une microculture sur collodion supporté par le milieu solide de la figure 3. Age 18,5 h à 30° C. Colorée par la méthode de Ziehl-Neelsen.

FIG. 5 A (55-B, 29). — Microculture sur collodion supporté par le milieu solide des figures 3 et 4. Age 4 h et 10 mn à 30° C. Après fixation par le formol gazeux la préparation fut montée dans la thionine acidifiée de la figure 3, A.

FIG. 5 B (55-B, 30). — Les mêmes cellules de A montées dans une solution de bleu de méthylène à pH 3,15 (Cf. [4]) après absorption complète de la thionine.

FIG. 5 C (55-B, 32). — Les mêmes cellules de A et B après coloration par la méthode de Ziehl-Neelsen.

FIG. 6 A (55-J, 10). — Une microculture sur collodion supporté par le milieu solide des figures 3 à 5. Age 29,5 h à 30° C., fixée par le formol gazeux et montée dans une solution de bleu de méthylène à pH 3,15. Les granules indiqués par les flèches sont des noyaux primaires. Les granules plus volumineux, comme les granules terminaux à droite, sont des noyaux composés.

FIG. 6 B (55-J, 13). — Les mêmes cellules de A colorées par la méthode de Ziehl-Neelsen. Notons que les noyaux primaires de A (indiqués aussi par des flèches) sont acido-résistants.

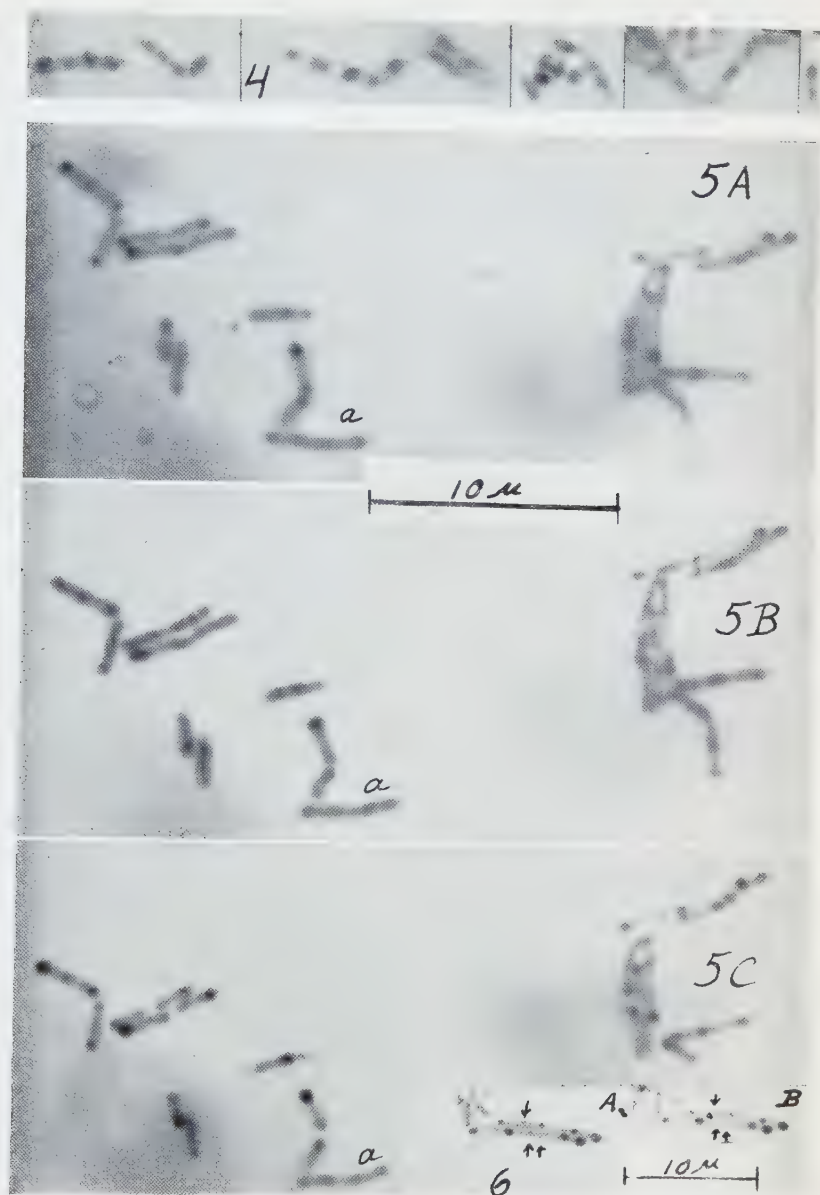


PLANCHE II.



is weakened by the presence of colorless vacuoles. A method of studying the same cells after various consecutive treatments is described.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] HILLIER (J.), KNAYSI (G.) et BAKER (R. F.). *J. Bact.*, 1948, **56**, 569.
- [2] KNAYSI (G.). *J. inf. Dis.*, 1929, **45**, 13.
- [3] KNAYSI (G.). *J. Bact.*, 1952, **64**, 859.
- [4] KNAYSI (G.). *J. Bact.*, 1955, **69**, 117.
- [5] KNAYSI (G.), HILLIER (J.) et FABRICANT (C.). *J. Bact.*, 1950, **60**, 423.
- [6] LAMANNA (C.). *J. Bact.*, 1946, **52**, 99.
- [7] YEGIAN (D.) et BAISDEN (L.). *J. Bact.*, 1942, **44**, 667.
- [8] YEGIAN (D.) et VANDERLINDE (R. J.). *J. Bact.*, 1947, **54**, 777.

SUR UNE MODALITÉ PARTICULIÈRE D'ACTION DE LA SPIRAMYCINE IN VITRO

par D. VIDEAU et H. JONCHÈRE (*).

(Laboratoire Central d'Essais biologiques de la Société Parisienne
d'Expansion Chimique SPECIA)

Au cours d'essais sur l'action bactéricide de la spiramycine, nous avons utilisé une technique de décalque proposée par Lederberg [1] pour l'isolement de germes mutants. A Manten [2] ayant adapté ce procédé à l'étude de l'érythromycine, nous l'avons repris en vue de comparer érythromycine et spiramycine.

I. — TECHNIQUE DU DÉCALQUE.

Dans un premier temps, on ensemence sur gélose, en boîte de Petri, un staphylocoque, par exemple. On place, sur la surface ensemencée, soit une solution de spiramycine, dans un petit cylindre métallique, soit un disque imprégné de cet antibiotique. Après dix-huit à vingt-quatre heures d'étuve on a, autour du cylindre ou du disque, une auréole d'inhibition plus ou moins grande selon la sensibilité du germe. Pour la commodité de l'exposé nous appellerons l'aspect de cette culture avec la zone d'inhibition : *la première image*.

Dans un second temps, après avoir enlevé cylindre ou disque, on applique à la surface de cette première culture, une pièce de velours de coton stérile, du diamètre de la boîte ; on transporte ce velours sur une gélose neuve, on l'applique avec soin et on le retire. Chaque poil du tissu a joué le rôle d'ensemencement.

Les boîtes qui portent ce « repiquage » sont alors placées à l'étuve à 37° C ; les colonies transplantées, d'abord peu visibles, donnent, petit à petit, une culture qui reproduit la première image. Nous appellerons « décalque » l'aspect de cette nouvelle gélose.

C'est en suivant d'heure en heure l'aspect de ce décalque que nous avons observé le phénomène qui fait l'objet de cette note.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 octobre 1956.

II. — FAITS OBSERVÉS.

Le décalque d'auréoles d'inhibition données par un antibiotique sur une culture de staphylocoques, commence à être lisible vers la troisième heure à 37°, c'est-à-dire lorsque la croissance des colonies repiquées devient suffisante pour être aisément appréciée à l'œil nu.

Les photographies ci-jointes montrent d'une part la première image obtenue avec trois antibiotiques (pénicilline, érythromycine,

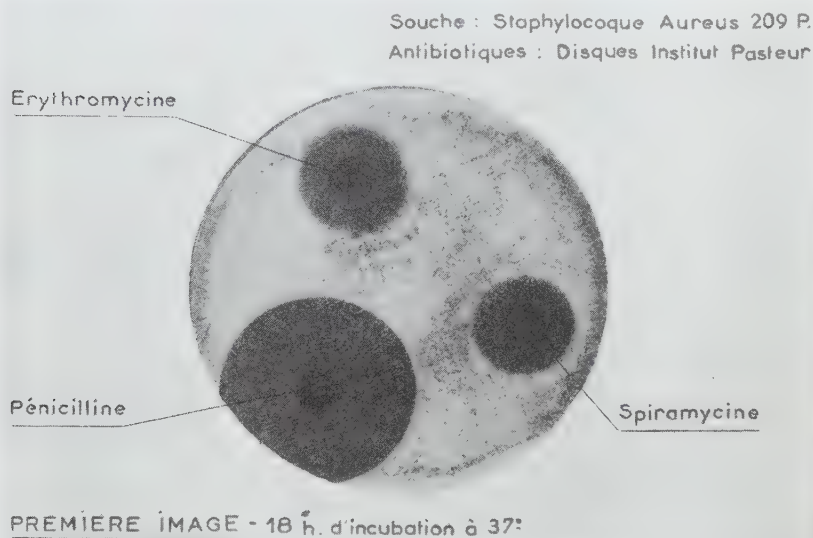


FIG. 1. — (Cliché du Service photographique de l'Institut Pasteur, M. Manigault)

spiramycine), d'autre part, le décalque de cette image sur une gélose neuve.

Alors que la première image ne présente que deux zones franches : une zone centrale d'inhibition et une zone périphérique de culture dense du germe, le décalque montre pour la seule spiramycine, du centre à la périphérie :

1° La zone sans culture qui correspond à l'auréole de la première image, nous l'appellerons : *zone I*.

2° Une large bande périphérique à bords nets où la densité de culture est restée au stade ombré qui correspond au moment de l'application du velours : *zone II*.

3° La culture de densité normale qui couvre le reste de la surface de la gélose : *zone III*.

La zone II est particulièrement intéressante. Elle met en évidence une action importante de l'antibiotique, laquelle, sans cet artifice, demeure invisible avec les techniques habituelles de mise en évidence de l'activité antibiotique d'un produit sur un germe déterminé.

Après la cinquième heure d'étuve, cette zone II s'estompe légèrement, les colonies en bactériostase qui la composent commencent

DECALQUE -

La croissance des colonies a été arrêtée après 4 h. d'étuve à 37°c.

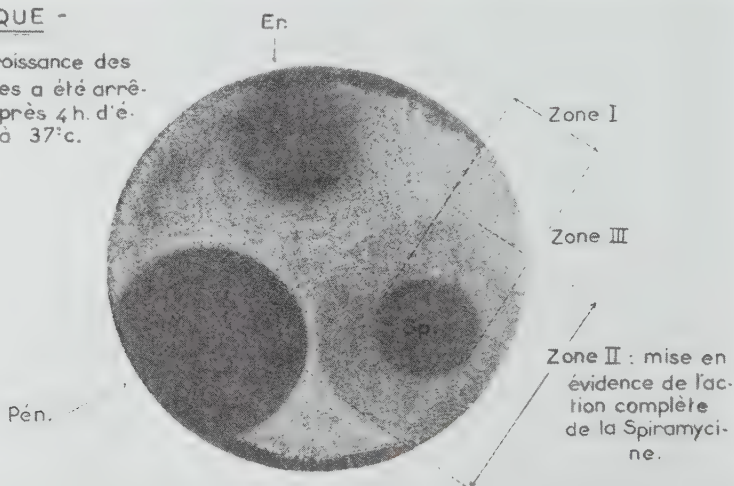


FIG. 2. — (Cliché du Service photographique de l'Institut Pasteur, M. Manigault.)

à se développer, mais son emplacement se devine encore après dix-huit, vingt-quatre et quarante-huit heures.

Nous avons de la sorte mis en évidence deux points intéressants :

1° En plus de l'action classique, se manifestant par l'apparition d'une auréole dans la méthode de diffusion en gélose, la spiramycine présente une action antibactérienne supplémentaire importante.

2° Cette action semble comporter à la fois une action de bactériostase et, à un degré plus faible, une action de bactéricidie (persistance de la zone II).

Si nous chiffrons cette observation pour en préciser l'import-

tance, voici les résultats obtenus pour des staphylocoques sensibles à la spiramycine :

Diamètre de l'auréole d'inhibition de la première image : 20 à 25 mm.

Diamètre de l'auréole sur le décalque (zones I et II) : 40 à 55 mm.

Avant d'étudier plus en détail ce phénomène, signalons qu'il ne s'observe pas avec les antibiotiques suivants : pénicilline, chloramphénicol, tétracycline, néomycine, bacitracine, framycétine, actinomycine, puromycine, novobiocine.

Tout au plus trouve-t-on quelques traces, 1 à 2 mm de plus pour l'auréole du décalque avec : sulfate de streptomycine, sulfate de dihydrostreptomycine, pantothénate de dihydrostreptomycine, néomycine et bacitracine.

Par contre, le même phénomène peut s'observer avec l'érythromycine et la carbomycine, mais il n'a jamais l'importance et la netteté de ce que l'on voit avec la spiramycine.

Nous avons éprouvé de la même manière un certain nombre de substances antiseptiques, et quelques sulfamides.

Citons celles qui ne donnent rien d'analogue : permanganate de potassium, chloramine T, phénol, bichlorure de mercure, thymol, formol, acide salicylique, orsanine, sapocrésol, fluorure de sodium.

Certaines autres substances donnent des zones II étroites mais cependant assez nettes telles que : mercurésceïne sodique, acryflavine, mépacrine, sulfathiourée, sulfathiazol, sulfamérazine diaminodiphénylsulfone.

Dans l'ensemble, ces actions secondaires sont très peu marquées en comparaison de celle de la spiramycine.

Une étude systématique de l'action de cet antibiotique sur 40 souches de staphylocoques nous a montré que toutes les souches sensibles donnent ce phénomène, que 50 p. 100 des souches peu sensibles le donnent aussi et que, sur 2 souches résistantes, l'une présente une zone II importante.

Cette action se manifeste sur des germes autres que le staphylocoque ; nous l'avons observée avec différentes espèces : plusieurs souches d'entérocoques, une souche de sarcine et des bacilles « Gram positif » (*B. subtilis*, *B. cereus*). Elle est d'autant plus nette que le germe présente une croissance rapide et une bonne sensibilité à l'antibiotique.

III. — EXPÉRIMENTATION COMPLÉMENTAIRE.

Nous avons pensé que ce phénomène pouvait être dû soit à la composition, soit à un mode particulier de diffusion de la spiramycine.

1° Nous avons opéré tout d'abord avec un produit brut qui est, comme on le sait [3], un mélange de plusieurs bases. Avec deux de ces bases pures et cristallisées, nous avons observé le même phénomène ainsi qu'avec les différents sels que nous avons éprouvés.

2° Pour vérifier s'il s'agissait d'un mode particulier de diffusion de la spiramycine, nous avons mis au réfrigérateur (5°) et à l'étuve (37°) des géloses portant des disques de spiramycine. Nous avons laissé diffuser le produit pendant vingt-quatre heures, avons retiré les disques et avonsensemencé les géloses qui sont mises à l'étuve dix-huit heures à 37°.

Après ce temps d'incubation, on note en « première image » une auréole plus grande qu'habituellement : 30 à 35 mm au lieu de 20 à 25. Le décalque fait encore apparaître la zone II ; elle est très grande, atteignant 70 mm. On peut considérer qu'en vingt-quatre heures la diffusion a été à peu près complète et que l'antibiotique a atteint une distance telle de son point de diffusion qu'il n'ira pas plus loin. Et pourtant les deux zones persistent sur le décalque.

Cette expérience de « prédiffusion » montre que la double zone sur le décalque n'est pas due à une *interférence* entre la vitesse de croissance du germe et une particularité de diffusion de la spiramycine.

On aurait pu penser, en effet, que le décalque permettait le repiquage de colonies d'aspect normal mais cependant inhibées par l'antibiotique après leur croissance.

3° Nous avons recherché dans le même esprit comment se comporte l'antibiotique sur une culture *déjà développée*. On place un disque de spiramycine à la surface d'une culture de vingt-quatre heures, on le laisse quatre heures en contact et, après l'avoir enlevé, on repique cette culture à l'aide d'une pièce de velours stérile. Le temps de contact et de diffusion a été suffisant pour faire apparaître sur le décalque une zone de croissance très faible qui correspond à la zone II déjà décrite. Dans les mêmes conditions d'essai les autres antibiotiques ne donnent rien d'analogue.

4° Pour comprendre l'action de la spiramycine dans la zone II, nous avons suivi, en bouillon, l'aspect des courbes de croissance de germes prélevés, après dix-huit heures d'étuve, en différents points d'une culture sur gélose d'un staphylocoque soumis à l'action de la spiramycine.

Sur une boîte de Petri ensemencée portant des disques de spiramycine et laissée dix-huit heures à l'étuve, nous faisons à l'anse de platine trois prélèvements : l'un (A) en bordure de l'auréole d'inhibition, l'autre (B) en pleine zone de ce qui sera sur le

décâlque la zone II et le troisième (C) dans la zone extérieure, de colonies normales.

Rien ne différencie ces trois prélèvements à première vue. Ils sont dilués convenablement pour donner la même opacité à l'électrophotomètre Meunier.

On ensemence chacun d'eux dans une série de 10 tubes qui sont examinés après une, deux, trois, quatre, cinq, six, sept, huit, neuf, vingt-quatre heures de bain-marie. On mesure la turbidité à l'électrophotomètre et on trace les courbes de croissance.

Par rapport à la courbe de croissance de (C) prise comme témoin, les courbes de (A) et de (B) montrent des temps de latence d'autant plus grands que le prélèvement est plus près de la zone inhibée (temps de latence de A plus grand que celui de B).

L'action qui intervient dans cette zone est donc fonction de la concentration en spiramycine du substrat. L'image du décâlque avec une zone II d'aspect homogène et des bords nets, ne nous en assurait pas.

IV. — ETUDE DE L'ACTION DE LA SPIRAMYCINE

PAR LA MÉTHODE DES DILUTIONS EN MILIEU NUTRITIF LIQUIDE.

De nombreuses déterminations de sensibilité de staphylocoques pathogènes par la méthode de dilution en bouillon, nous ont montré un dégradé de l'opacité des tubes qui précèdent le end-point (E. P.). En milieu liquide et après dix-huit à vingt-quatre heures d'étuve à 37° il existe donc une action analogue à celle qui n'est révélée en diffusion qu'à l'aide d'un artifice.

Nous avons choisi, pour étudier cet autre aspect du phénomène, un inoculum faible de manière à ne pas masquer par une opacité prématurée une action qui semble tardive et nous avons lu à l'électrophotomètre l'opacité des tubes qui précèdent le end-point, après dix-huit heures d'incubation à 37° C. Nous avons utilisé une gamme de spiramycine de progression géométrique (tableau I).

Le tableau I montre que l'action inhibitrice de la spiramycine débute au taux de 0,064 µg/ml et qu'elle va en augmentant avec

TABLEAU I. — Gamme de sensibilité du *Staphylocoque aureus* à la spiramycine.

CONC. SPIRAMYCINE µg/ml DE BOUILLON	Témoin	0,001	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,128	0,256	0,5	1	2	4	8	16
OPACITÉS À L'ÉLECTROPHOTOMÈTRE.	276	276	276	276	276	276	276	260	246	230	199	62	28	0	0	0

Les valeurs d'opacité placées au-dessous des concentrations de spiramycine ont été mesurées à l'électrophotomètre Meunier.

la concentration pour être complète au taux de 4 µg/ml de bouillon.

Nous avons étudié parallèlement l'action de deux autres antibiotiques, l'un : érythromycine parce qu'il se comporte en diffusion d'une façon analogue, bien que plus atténuée, l'autre : pénicilline qui représente dans cet essai les antibiotiques qui ne donnent pas de zone II en décalque sur gélose.

Nous avons donc préparé trois gammes identiques dont les concentrations sont exprimées en µg de produit par ml ; l'inoculum mélangé au milieu de culture avant la distribution du bouillon est le même pour les trois gammes.

L'opacité des tubes, laissés dix-huit heures à 37°, est lue le lendemain à l'électrophotomètre de Meunier (tableau II).

TABLEAU II. — Concentrations en antibiotiques et opacité à l'électrophotomètre.

µg/ml	T	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,128	0,256	0,5	1	2	4	8	16
SPIRAMYCINE	276	276	276	276	276	276	276	276	260	246	230	199	62	28	0	0	0
ÉRYTHROMY.	276	276	276	276	276	276	276	262	245	217	112	0	0	0	0	0	0
PÉNICILLINE	276	276	276	276	276	246	41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Si l'on désigne par *dose minima active* (DmA) la plus faible concentration d'antibiotique entraînant une inhibition partielle de la culture par rapport au témoin et par E. P. (end-point) la première concentration donnant une *inhibition totale*, le rapport $\frac{\text{DmA}}{\text{E. P.}}$ exprime l'étendue de l'action des doses sub-bactériostatiques de chaque antibiotique.

Dans le cas de l'expérience ci-dessus, ce rapport est de :

$$\text{Pour la pénicilline } \frac{0,032}{0,008} = 4.$$

$$\text{Pour l'érythromycine } \frac{0,5}{0,032} = 15,6.$$

$$\text{Pour la spiramycine } \frac{4}{0,064} = 62,5.$$

Ce rapport est particulièrement favorable pour la spiramycine dont il montre une action bien particulière.

Afin de nous mettre dans les conditions des observations faites sur gélose après décalque, nous avons repiqué en milieu neuf chaque tube des gammes précédentes. Ceux-ci sont centrifugés ; le culot lavé et recentrifugé est repris dans 10 ml d'eau physiologique et réparti à raison de 11 gouttes par tube de bouillon neuf. Les lectures sont faites à l'électrophotomètre après deux, quatre, six et huit heures de bain-marie à 37°.

Nous ne donnerons pas le tableau complet du développement de ces repiquages. Il nous semble assez démonstratif de donner les courbes de croissance des tubes suivants :

Tube à 0,128 μg pour la spiramycine ;

Tube à 0,064 μg pour l'érythromycine ;

Tube à 0,008 μg pour la pénicilline.

En effet, ces trois tubes présentent une turbidité analogue et se trouvent bien placés par rapport au end-point de chaque antibiotique (fig. 3).

Les phases de latence des germes débarrassés par lavage des

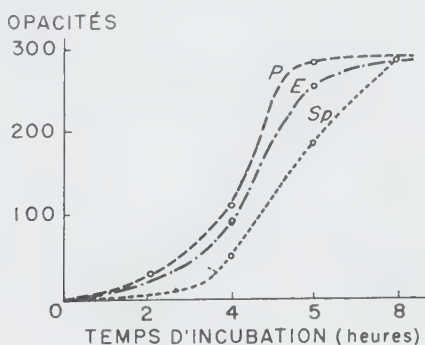


FIG 3.°

antibiotiques auxquels ils étaient soumis mettent en évidence ici encore l'effet prolongé de la spiramycine.

V. COMMENTAIRES.

Nous sommes donc en présence d'une action particulière à la spiramycine [et probablement aux antibiotiques de son groupe] (1). Elle consiste en une action sub-bactériostatique tardive et persistante qui ne s'observe pas pour les autres antibiotiques étudiés.

Cette action nous a semblé suffisamment importante pour mériter d'être signalée. Nous n'avons pas réussi à expliquer jusqu'ici ce phénomène qui est certainement complexe, mais nous

(1) Ce groupe comprendrait actuellement érythromycine, carbomycine, PA 105 et spiramycine. Des résistances croisées ont été observées entre la spiramycine et les autres produits par Y. Chabbert [5], S. Pinnert-Sindico et J. Pellerat [6]. Y. Chabbert [7] a également souligné que des souches résistantes à l'érythromycine conservaient leur sensibilité à la spiramycine et que l'on notait même, dans certains cas, un antagonisme entre ces deux antibiotiques.

poursuivons nos essais en prenant pour base de travail le résumé suivant de nos observations.

Associée à une activité antibiotique de type classique, la spiramycine présente, de plus, dans le cadre de nos essais, une action particulière qui se manifeste à l'égard de différents germes, les staphylocoques en particulier.

Cette action est caractérisée par des phénomènes associés de bactériostase et de bactéricidie qui se produisent à retardement pour des concentrations nettement inférieures à la concentration bactériostatique déterminée par les méthodes classiques (end-point, diamètre de la zone d'inhibition).

Des essais en cours, réalisés sur des cultures vivantes de staphylocoques, montrent qu'il existe une réelle fixation de la spiramycine sur les germes maintenus à 37° ; elle augmente avec le temps de contact pour se stabiliser après la sixième heure. Un essai parallèle montre qu'à 4° on ne peut observer aucune fixation.

S'il est assez facile d'étudier dans le temps la fixation de la spiramycine sur les corps microbiens en raison de la très grande stabilité de cet antibiotique, cela n'est que partiellement réalisable avec les autres antibiotiques dont certains se détruisent rapidement. Nous avons cependant pu nous assurer qu'en six heures la pénicilline ne montre aucune fixation sur des staphylocoques (non sécréteurs de pénicillinase).

Il semble donc que des doses de spiramycine très inférieures aux concentrations bactériostatiques sont capables d'atteindre dans le temps, *par accumulation*, un seuil d'activité antibiotique qui expliquerait le phénomène observé.

Nous pensons que ces faits permettront peut-être d'expliquer la dissociation apparente, signalée par plusieurs auteurs, Crosnier et Darbon [4] en particulier, entre les résultats médiocres donnés *in vitro* par les méthodes classiques et les heureux effets observés *in vivo* dans la thérapeutique de certaines maladies infectieuses par la spiramycine.

RÉSUMÉ.

Utilisant la technique de Lederberg, nous avons étudié la croissance à 37° du décalque de l'image donnée par l'action inhibitrice sur gélose de divers antibiotiques. Cette technique appliquée à la spiramycine montre une action antibiotique *retardée* des doses faibles, sur les germes pathogènes et non pathogènes éprouvés, en particulier sur *Mic. pyogenes* et *Str. faecalis*.

Cette action différée semble distincte de l'action bactéricide et de l'action bactériostatique proprement dite. Il s'agit vraisemblablement d'un troisième type d'action antibiotique.

Des expériences en cours laissent supposer que la spiramycine se fixe d'une façon particulière sur les corps microbiens.

Par l'étude du rapport $\frac{E. P.}{DmA}$ (End-point/dose minima active) de la pénicilline, de l'érythromycine et de la spiramycine, nous sommes amenés à penser que cette action est suffisamment importante pour qu'on en tienne compte dans l'évaluation de la sensibilité des germes à la spiramycine.

Cette idée est corroborée par l'aspect dégradé de la turbidité des « gammes », lors de la détermination de la sensibilité de souches récemment isolées, par la méthode des dilutions en bouillon.

Dans une certaine mesure, cette action particulière pourrait expliquer la discordance observée par plusieurs auteurs entre les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* avec cet antibiotique.

SUMMARY

A PECULIAR MODE OF ACTION OF SPIRAMYCIN *in vitro*.

By means of Lederberg's technic, the authors have studied the inhibiting action of several antibiotics.

Low doses of spiramycin possess a delayed antibacterial power for pathogenic and non pathogenic germs, especially for *Mic. pyogenes* and *Str. faecalis*.

This delayed action appears different from the actual bactericidal and bacteriostatic powers.

Experiments still in progress suggest for spiramycin a particular mode of fixation on the bacterial cell.

The ratio EP/DmA of penicillin, erythromycin and spiramycin suggests that the delayed action is important enough to be taken into consideration in the evaluation of germs sensitivity to spiramycin.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LEDERBERG (J.) et LEDERBERG (E. M.). *J. Bact.*, 1952, **63**, 399.
- [2] MANTEN (A.). *Antibiotics and chemotherapy*, 1954, **4**, 1228 et 1956, **6**, 480.
- [3] PINNERT-SINDICO (S.), NINET (L.), PREUD'HOMME (J.) et COSAR (C.). *Antibiotics Annual*, 1954-1955, 724.
- [4] DARBON (A.) et CROSNIER (R.). *La Presse Médicale*, 1955, **63**, 681.
- [5] CHABBERT (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 434.
- [6] PINNERT-SINDICO (S.) et PELLERAT (J.). *Thérapie*, 1956, **11**, 308.
- [7] CHABBERT (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 787.

**PROPRIÉTÉS DU SÉRUM DES CHEVAUX SOUMIS
A DES IMMUNISATIONS SUCCESSIVES
ET A DES SAIGNÉES RÉGULIÈRES.
PERSISTANCE DE L'EFFET PRODUIT
PAR LES PREMIERS ANTIGÈNES**

par MAYLIS GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. GEOFFROY. (*)

(*Institut Pasteur*)

De nombreux dosages ont mis en évidence que l'antitoxine diphtérique existe à un taux important dans le sang circulant des chevaux un an après la dernière injection d'antigène spécifique ; d'après Barr et Glenney [1], ce taux est en relation avec le nombre d'injections faites aux chevaux et avec le titre antitoxique des sérums au moment de la suppression des inoculations.

En 1952, Sédallian, Berger et Carraz [2] signalent que des chevaux saignés mensuellement après l'arrêt de l'hyperimmunisation anti-diphtérique possèdent encore une immunité résiduelle à un niveau relativement élevé plusieurs années après cessation des injections d'antigène diphtérique ; ces faits conduisent les auteurs à supposer que l'organisme d'un animal anciennement hyperimmunisé produit pendant longtemps de nouvelles molécules d'antitoxine diphtérique en l'absence d'antigène et malgré des saignées abondantes.

En recherchant les principales propriétés antitoxiques du sérum de différents chevaux soumis à plusieurs immunisations successives anti-gangréneuses et à de nombreuses saignées, nous avons pu évaluer la régression de la première immunité au cours des immunisations ultérieures poursuivies activement pendant des temps variables.

Dans le présent exposé, nous rapportons quelques-uns des résultats que nous avons obtenus en titrant des sérums de chevaux ayant reçu, au cours de la première immunisation, des injections réitérées d'anatoxine *histolyticum* ; au cours de la deuxième, des injections de toxine *septicum* ou d'anatoxine

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 4 octobre 1956.

perfringens et, au cours de la troisième, de nouvelles injections d'anatoxine *histolyticum*. Nous citons, en outre, le cas d'un cheval sollicité à produire successivement les anticorps suivants : anti-*histolyticum*, anti-*septicum*, anti-*œdematiens* et, derechef, anti-*septicum* ; nous insistons sur les titres anti-*histolyticum* α et β des sérums prélevés aux chevaux pendant les immunisations consécutives ; nous signalons brièvement les titres anti-*septicum*, anti-*œdematiens*, anti-*perfringens* α , θ et K de quelques-uns de ces immunsérums.

Les prélèvements de sang, fréquemment réalisés au début de chaque immunisation, ne dépassent pas 40 à 50 ml. Ensuite, les saignées sont de 12 à 14 l : elles sont faites toutes les cinq semaines aux chevaux qui reçoivent des injections d'antigènes *histolyticum* et toutes les quatre semaines aux chevaux producteurs d'antitoxines anti-*septicum*, anti-*œdematiens* ou anti-*perfringens*.

Les antigènes employés pour immuniser les chevaux et titrer les sérums sont préparés en bouillon Vf avec les souches Letivi (*Cl. histolyticum*), Feunten (*Cl. septicum*), SS (*W. perfringens*) et 5 (*Cl. œdematiens*). Rappelons que les cultures de *Cl. septicum* sont dépourvues de propriétés collagénasiques.

Titrage des sérums.

I. — DÉTERMINATIONS *in vivo*.

Les titres anti-*histolyticum* α (anti-*hist.* α), anti-*septicum* (anti-*sept.*), anti-*œdematiens* et anti-*perfringens* α sont recherchés en présence de la dose L+ des toxines homologues précipitées par le sulfate neutre d'ammonium [3] ou en présence d'une fraction de la dose L+ de ces toxines en solution dans de l'eau physiologique. Les sérums sont dilués avec de l'eau physiologique. Les mélanges de toxine et de sérum sont injectés à des souris blanches de 17 à 20 g. Les résultats sont exprimés en unités internationales (UI) par millilitre de sérum.

II. — DÉTERMINATIONS *in vitro*.

a) RECHERCHE DU POUVOIR ANTI-COLLAGÉNASIQUE D'UN SÉRUM. — Nous évaluons le pouvoir anti-collagénasique en présence de toxine liquide : *histolyticum* ou *perfringens*. Nous déterminons, d'abord, la dose minima collagénasique de chaque toxine (1),

(1) La toxine histolytique est titrée en présence de tampon phéniqué et de collagène A dans des conditions analogues à celles que nous suivons pour évaluer l'activité collagénasique de la toxine *perfringens* liquide [4].

c'est-à-dire le volume de toxine qui détruit totalement ou presque totalement une pastille de collagène A en quarante-huit heures à 37-38° ; ensuite, nous testons le sérum. Dans une série de tubes stériles, nous introduisons une quantité fixe de toxine, des doses décroissantes du sérum à titrer ; nous complétons à 1 ml avec de l'eau physiologique tamponnée à pH 6,5 par des phosphates et additionnée de 0,3 p. 100 de phénol (tampon phéniqué) ; nous mettons une pastille de collagène A dans le liquide de chaque tube et plaçons les tubes dans une étuve à 37-38° [4]. Nous prenons comme point final du titrage le plus petit volume de sérum en présence duquel la dose d'épreuve de toxine ne détermine en quarante-huit heures à 37-38° qu'une dissolution très légère du collagène. Par exemple, si ce résultat est atteint en présence de 1/25 ml de sérum (0,04 ml), nous notons que le sérum titre 25 unités provisoires (up) ; si le collagène n'est pas attaqué dans le tube contenant 0,04 ml de sérum, s'il est par contre détruit dans celui qui contient la toxine et 0,02 ml de sérum, nous considérons que le sérum titre entre 25 et 50 up. Les dilutions des sérums sont réalisées avec le tampon phéniqué.

Toxines utilisées dans les titrages in vitro.

1° Après avoir déterminé la dose minima collagénasique β (Dm β) de trois toxines histolytiques liquides numérotées 52, 55, 56, nous avons utilisé comparativement ces trois toxines pour apprécier le pouvoir anti-collagénasique β d'un même sérum ; dans ce but, nous avons déterminé le volume de sérum qui inhibe quatre doses minima collagénasiques (4 Dm β) de l'une ou de l'autre de ces toxines ; nous avons ainsi constaté que les résultats variaient avec les toxines. En voici des exemples : a) en expérimentant avec le sérum de l'une des saignées faites au cheval 384, on voit que 0,2 ml de ce sérum n'empêche pas la dose d'épreuve de la toxine 52 de dissoudre le collagène A en quarante-huit heures ; par contre, 0,1 ml de ce sérum inhibe la toxine 55 et il suffit même de 1/30 de millilitre du même sérum pour neutraliser 4 Dm β de la toxine 56 ; b) des observations sensiblement analogues sont faites en prenant ces trois toxines pour titrer un des sérums prélevés au cheval 881 ; c) le titrage d'un sérum provenant du cheval 1102 révèle qu'il faut une dose de sérum comprise entre 1/25 et 1/50 de millilitre pour inhiber 4 Dm β de la toxine 52 ; or 4 Dm β des toxines 55 et 56 sont respectivement inhibées par 1/150 et 1/400 de millilitre du même sérum.

De tels faits montrent que l'affinité de la collagénase β présente dans la toxine 52 est moindre que celle des toxines 55 et 56 pour l'anti-collagénase β des sérums examinés.

Après cette constatation, nous avons déterminé le pouvoir combinant $L\beta$ de ces trois toxines avec le sérum étalon anti-histolyticum danois (ce sérum contient 20 unités anti-hist. α par millilitre) ; nous avons recherché le volume de toxine histolytique qui, mélangé à 0,005 ml d'étalon anti-histolyticum danois, attaque légèrement en quarante-huit heures à 37-38° une pastille de collagène A. Nous avons vu que la quantité de sérum étalon employé neutralise : 4 Dm β de la toxine 52, 9 Dm β de la toxine 55 et 14 Dm β de la toxine 56. La dose $L\beta$ des toxines énumérées ne représente donc pas le même nombre de doses collagénasiques : elle contient 4 à 14 doses minima collagénasiques d'après les titrages en présence de collagène A.

Nous avons alors décidé d'utiliser une seule préparation de toxine histolyticum, la toxine 56, pour évaluer le pouvoir anti-collagénasique de tous les sérums ; le titre de chacun d'eux est recherché en présence de 4 Dm β de cette toxine. Cette dose d'épreuve permet de déceler les propriétés anti-collagénasiques β des sérums de faible titre.

2° Le titre anti-collagénasique K des sérums est déterminé vis-à-vis de 10 doses minima collagénasiques (DmK) d'une seule préparation de toxine *perfringens* liquide.

Collagène A employé dans les titrages in vitro.

Pour déterminer la dose minima collagénasique des toxines histolytiques et *perfringens* puis le pouvoir anti-collagénasique des sérums, nous avons préparé une abondante solution de collagène A dans des conditions indiquées par Nageotte [5]. Les tendons de dix queues de rats sont mis dans 1 500 ml de solution acétique au 1/10 000. La solution est filtrée sur gaze quarante-huit heures plus tard. Nous utilisons tout le filtrat en quatre jours par portions de 80 ml. Nous ajoutons à ces 80 ml de filtrat 80 ml d'une solution de ClNa à 2,5 p. 100 ; le collagène précipite ; il est recueilli sur un filtre de 46 mm de diamètre. En se desséchant sur le filtre, le collagène forme une pellicule mince ; la pellicule est détachée sans la déchirer. Avec un emporte-pièce [6], on peut découper jusqu'à 64 pastilles dans cette pellicule. Suivant le poids de la pellicule obtenue à partir de chacune des portions aliquotes de filtrat que l'on additionne de ClNa, on prépare des pastilles de collagène pesant, à l'état sec, 0,235 à 0,245 mg. Ce collagène sec ne s'altère pas lorsqu'il est conservé à la température ambiante et à l'abri de l'humidité. La veille d'un titrage, des pastilles sont mises dans l'éther ; juste avant le titrage, elles sont lavées à l'eau physiologique stérile et introduites dans les tubes contenant les liquides à titrer.

b) RECHERCHE DU TITRE ANTI-*perfringens* α DES IMMUNSÉRUMS. — Le titrage est réalisé en présence d'un indicateur (sérum humain), d'eau physiologique, de Ca et d'une dose $Le/20$ de toxine *perfringens* précipitée par le sulfate neutre d'ammonium. Le titre est exprimé en unités internationales.

c) RECHERCHE DU TITRE *ANTI-perfringens* 0. — Le dosage est effectué en présence d'hématies lavées de mouton et de la dose LH/10 d'une toxine *perfringens* précipitée par le sulfate neutre d'ammonium.

Immunisation des chevaux.

L'anatoxine *histolyticum* fait apparaître des quantités extrêmement variables d'anticorps homologues dans le sérum des chevaux traités dans les mêmes conditions [3 b]. Lorsque nous connaissons l'aptitude de différents chevaux à engendrer l'antitoxine *histolyticum* α , nous déclenchons la formation d'autres antitoxines chez un certain nombre de ces animaux. Voici quelques observations relatives, d'une part, à des chevaux *initialement* mauvais producteurs d'antitoxine *histolyticum* α , d'autre part, à des chevaux produisant rapidement cette antitoxine en quantité importante après des injections d'anatoxine histolytique.

I. Chevaux ayant produit peu d'antitoxine *histolyticum* α pendant l'immunisation spécifique. Résultat des immunisations ultérieures.

Quand le titre anti-*histolyticum* α du sérum des chevaux reste inférieur à 75 UI malgré des injections d'anatoxine *histolyticum* faites pendant quelques mois, nous cessons les injections de cette anatoxine. Peu de temps après (dix-huit à vingt et un jours), nous préparons une partie de ces chevaux contre les antigènes élaborés par *Cl. septicum* ou *W. perfringens*. Trois de ces chevaux sont cités dans le tableau I (881, 384, 1102).

TABLEAU I. — Enumération des antigènes successivement injectés à cinq chevaux.

Numéro du cheval	Antigènes injectés	Date de la première et de la dernière injection des antigènes cités	Durée de chaque immunisation
881	histolyticum	27-VIII-1951; 8-XI -1951	73 jours (1ère immunisation)
	septicum	26 XI -1951; 29-X -1953	23 mois (2ème immunisation)
	histolyticum	23-XI -1953; 24-III -1955	16 mois (3ème immunisation)
384	histolyticum	26-VIII -1948; 16-XII -1948	112 jours (1ère immunisation)
	septicum	6-I -1949; 20-XX -1951	32 mois 14 j. (2ème immunisation)
	œdematiens	8-10 -1951; 9-X -1952	12 mois (3ème immunisation)
	septicum	27-X -1952; 13-VII -1953	8 mois 17 j. (4ème immunisation)
1102	histolyticum	2-VII -1952; 8-I -1953	6 mois (1ère immunisation)
	perfringens	21-I -1953; 6-VIII -1953	6 mois 16 j. (2ème immunisation)
	septicum	27-VIII -1953; 17-XII -1953	12 jours (3ème immunisation)
1084	histolyticum	1er-V -1952; 21-II -1954	22 mois (1ère immunisation)
	perfringens	5-IV -1954; 23-IX -1954	171 jours (2ème immunisation)
1011	histolyticum	20-XII -1951; 4-III -1954	26 mois 15 j. (1ère immunisation)
	perfringens	5-III -1954; 19-VII -1956	28 mois 14 j. (2ème immunisation)

j., jours.

Troisième colonne, huitième ligne, au lieu de : 20-XX-1951, lire : 20-IX-1951.

A. LA DEUXIÈME IMMUNISATION EST PROVOQUÉE PAR DES INJECTIONS D'ANTIGÈNES *septicum*. — Il se produit trois phénomènes concomitants pendant cette deuxième immunisation : a) une élaboration progressive d'antitoxine anti-*septicum* ; b) un accroissement du titre anti-*histolyticum* α du sérum de la majorité des chevaux ; c) la régression de l'anti-collagénase *histolyticum* β dans le sang.

Des exemples numériques particulièrement frappants sont groupés dans les tableaux II et III. On voit, dans le tableau II,

TABLEAU II. — **Activité antitoxique du sérum du cheval 881 préparé successivement contre *Cl. histolyticum* (première immunisation), *Cl. septicum* (deuxième immunisation) puis, encore une fois, contre les antigènes de *Cl. histolyticum* (troisième immunisation).**

Antigènes injectés	Sérum récolté le :	Temps écoulé	Pouvoir anti-histolyticum			Titre anti-septicum UI
			anti- α UI	anti- β up	au bout de	
histolyticum	5-X	-1951	(39 jours)	50	5000	nul
	6-XI	-1951	(81 jours)	25-30		
<i>septicum</i>	31-XII	-1951	(35 jours)	100-150		25-50
	27-V	-1952	(182 jours)	200-250	80	100
	18-VII	-1952		150-200	60	100
	7-XI	-1952	(346 jours)	600-800		250-300
	5-XII	-1952		600-800	25-50	250
	22-V	-1953		500-600	25-50	250
	11-IX	-1953		400	50	300
	6-XI	-1953		300-400	25-50	300
					[24 mois]	300
histolyticum	5-II	-1954	(74 jours)	400-500	3000	75-100
	5-II	-1955	(15mois)	400-500		50-75

Entre parenthèses : intervalle de temps entre la première inoculation de l'antigène considéré et la récolte du sérum titré.

Entre crochets : temps écoulé entre la dernière injection des antigènes de *Cl. histolyticum* et la récolte du sérum titré.

UI, unités internationales ; up, unités provisoires ; m., mois ; j., jours.

l'activité antitoxique de quelques-uns des sérums prélevés au cheval 881 au cours de trois immunisations consécutives. Pendant la première immunisation, ce cheval reçoit 1 685 ml d'anatoxine histolytique en seize injections ; pendant la deuxième, des injections d'anatoxine puis de toxine *septicum* ; pendant la troisième, de nouvelles injections d'anatoxine *histolyticum* (la durée de chaque immunisation est notée dans le tableau I). Le sérum le plus antitoxique prélevé au cheval 881 pendant la première immunisation contient 50 UI anti-*hist.* α et 5 000 up anti-*hist.* β . Pendant la deuxième immunisation, le sérum du cheval 881 acquiert un titre anti-*septicum* important et un pouvoir anti-*histolyticum* α intense : en effet, le titre anti-*septicum* atteint 300 UI et le titre anti-*histolyticum* α s'élève jusqu'à 600-800 UI (tableau II). Paral-

lèlement, la production de l'anti-collagénase β diminue : la régression est forte au début puis lente ultérieurement. Les sérums prélevés au cheval sept et huit mois après la fin de la première immunisation titrent seulement 80 et 60 up anti- β ; celui qui est récolté vingt-deux mois après cette immunisation contient 50 up et le sérum prélevé deux mois plus tard : 25 à 50. Par conséquent, après un nombre relativement faible d'inoculations d'antigènes *histolyticum*, malgré les injections ultérieures d'un antigène dépourvu de collagénase et malgré des saignées bimensuelles de 6 à 7 l chacune, l'anti-collagénase β existe encore à un taux décelable dans le sérum prélevé vingt-quatre mois après la dernière inoculation d'anatoxine histolytique au cheval 881.

Pour déterminer si ce cheval est alors susceptible d'accroître sa production d'anti-collagénase, les inoculations de toxine *septicum* sont remplacées par des injections d'anatoxine histolytique ; les résultats du tableau II montrent que cette intervention détermine une abondante élaboration d'anti-collagénase β et un léger accroissement du titre anti-*histolyticum* α des sérums.

Le tableau III rassemble l'essentiel des résultats que nous avons obtenus en soumettant le cheval 384 à quatre immunisations anti-gangréneuses successives (2).

1° Première immunisation : injection d'anatoxine *histolyticum* : temps écoulé entre la première et la dernière de ces inoculations, cent douze jours ; titre maximum observé, 50 à 75 UI anti-*hist.* α ; le sérum prélevé à la fin de cette immunisation contient 10 à 25 UI anti-*hist.* α et 1 400 up anti- β .

2° Le cheval reçoit ensuite des injections d'antigènes *septicum* pendant longtemps (tableau I). Durant cette deuxième immunisation, le titre anti-*histolyticum* α du sérum s'élève jusqu'à 250-300 UI ; le titre anti-collagénasique β diminue. A la fin de cette immunisation, le sérum contient 75 à 100 UI anti-*hist.* α et 30 up anti- β : lors du prélèvement de ce sérum, le cheval ne recevait plus d'injections d'antigènes *histolyticum* depuis trente-trois mois.

3° Puis des injections d'anatoxine *œdematiens* sont faites pendant douze mois au cheval 384 : le titre anti-*œdematiens* du sérum s'élève jusqu'à 4 000-6 000 UI (3). Les immunités anti-*histolyticum* et anti-*septicum* rétrogradent nettement en trente à soixante jours puis diminuent à peine pendant les mois suivants

(2) Avant nos essais, ce cheval avait reçu des injections d'anatoxine diphtérique et n'avait pas produit dans les délais normaux un sérum anti-diphtérique de titre convenable.

(3) Une unité internationale anti-*œdematiens* neutralise 1 370 DM de la toxine *œdematiens* employée au cours des titrages sur souris (injections sous-cutanées).

(tableau III); leur niveau de stabilisation est très faible : les sérums prélevés pendant les quatre derniers mois de l'immunisation considérée titrent seulement 5 à 10 UI anti-*hist.* α et 2 à 5 ou 2 UI anti-sept. Le pouvoir anti-collagénasique des mêmes

TABLEAU III. — Activité antitoxique du sérum du cheval 384 successivement préparé contre *Cl. histolyticum* (première immunisation), *Cl. septicum* (deuxième immunisation), *Cl. œdematiens* (troisième immunisation) et à nouveau contre *Cl. septicum*.

Antigènes injectés	Sérum récolté le :	Temps écoulé	Pouvoir anti-histolyticum			Titre anti-septicum UI	Titre anti-œdematiens UI
			anti- α UI	anti- β up	après un délai de		
histolyticum	4-X -1948		50-75				
	15-X -1948		50-75				
	19-XI -1948	(85 jours)	40-50				
	24-XII -1948	(4 mois)	10-25	1400		nul	
septicum	14-II -1949	(39 jours)	50-100			50	
	25-II -1949	(50 jours)	100-150			100	
	25-III -1949	(78 jours)	75-100	250	[99 jours]	100	
	5-VIII -1949	(7 mois)	150	100	[232 jours]	150-200	
	17-II -1950	(13 mois)	100-150	25-50	[428 jours]	150	
	1-IX -1950	(20 mois)	150-200	50	[620 jours]	100-150	
	27-X -1950	(21m, 21j.)	250-300			300	
	24-XI -1950	(22m, 18j.)	200-250			100-150	
	16-II -1951	(25m, 10j.)	200-250			50-75	
	6-VII -1951	(30 mois)	100-150			75-100	
	31-VIII -1951	(32m, 25j.)	75-100	30	[33 mois]	75-100	nul
œdematiens	9-XI -1951	(30 jours)	25			10-25	150
	14-XII -1951	(64 jours)	10-25			10	400-600
	11-I -1952	(3 mois)	5-10			5-10	1200-1500
	7-III -1952	(5 mois)	5-10			5-10	2200-2500
	30-V -1952	(8 mois)	5-10	6 à 10	[41 mois]	2	4000-6000
	19-IX -1952	(11 mois)	5-10			2-5	3000
	17-X -1952	(12 mois)	5-10		[46 mois]	2	2000-3000
septicum	14-XI -1952	(18 jours)	550-600			375-400	800-1000
	12-XII -1952	(46 jours)	600			300-350	400-600
	9-I -1953	(74 jours)	700-800	15	[49 mois]	350-400	200-300
	6-II -1953	(102 jours)	600-800			400	120
	3-IV -1953	(158 jours)	400-500			300-400	80-100
	26-VI -1953	(242 jours)	400-500			300-400	80-100

Entre parenthèses : intervalle de temps entre la première injection de l'antigène considéré et la récolte du sérum titré.

Entre crochets : temps écoulé entre la dernière injection des antigènes de *Cl. histolyticum* et la récolte du sérum titré.

UI, unités internationales ; up, unités provisoires ; m., mois ; j., jours.

sérums est minime. Celui qui est récolté huit mois après le début de la troisième immunisation, soit quarante et un mois après la dernière injection d'antigènes *histolyticum*, contient 6 à 10 up anti-*hist.* β . Nous avons contrôlé plusieurs fois la faible activité anti-collagénasique de ce sérum. Parallèlement, nous avons examiné des sérums de chevaux normaux, des sérums équins anti-*perfringens*, des sérums de chevaux n'ayant reçu que des injections d'antigènes *septicum* ; ces divers sérums, à la dose de 0,4 ml, n'ont pas empêché la toxine histolytique de détruire rapi-

dement le collagène A : nous les avons titrés exactement dans les mêmes conditions expérimentales que ceux du cheval 384 (4).

4° Le cheval 384 est enfin utilisé pour un ultime contrôle : il reçoit des inoculations de toxine *septicum* (5) pour susciter une réaction anamnétique complexe. Cette réaction se produit avec intensité : en dix-huit jours, le titre anti-*septicum* du sérum du cheval passe de 2 UI à 375-400 et le titre anti-*histolyticum* α de 5 UI à 550-600. Ultérieurement, le titre anti-*histolyticum* α augmente encore. En même temps, le cheval n'engendre pas un taux élevé d'anti-collagénase β : en effet, le sérum qui titre 350 à 400 UI anti-*septicum* et 700 à 800 UI anti-*hist.* α contient seulement 15 up anti-*hist.* β ; on peut voir dans la dernière partie du tableau III que ce même sérum est prélevé soixante-quatorze jours après la reprise des injections de toxine *septicum* et quarante-neuf mois après la dernière injection d'antigènes *histolyticum* ; ce léger pouvoir anti-*histolyticum* β est suffisamment prononcé pour permettre de penser que le cheval considéré élabore encore des traces d'anti-collagénase β quatre ans après l'arrêt de l'immunisation active.

L'observation suivante concerne un cheval ayant produit pendant les immunisations davantage d'anti-collagénase β que les chevaux 881 et 384 précédemment cités.

B. LA DEUXIÈME IMMUNISATION EST PROVOQUÉE PAR DES INJECTIONS D'ANATOXINE *perfringens*.

Le cheval 1102 est d'abord préparé contre les antigènes de *Cl. histolyticum* pendant six mois (première immunisation), ensuite contre ceux de *W. perfringens* pendant six mois et demi (deuxième immunisation), puis contre ceux de *Cl. septicum* pendant cent douze jours (troisième immunisation).

Trois mois après le début de la première immunisation, le sérum du cheval titre seulement 10 à 25 UI anti-*hist.* α . Le sérum prélevé trois mois plus tard contient peu d'antitoxine *histolyticum* α et une quantité importante d'anti-collagénase β : il titre en effet 10 UI anti- α et 14 000 up anti- β .

A cause de la faible immunité anti-*histolyticum* α de ce cheval, les injections d'anatoxine histolytique sont interrompues ; elles sont remplacées par des injections d'anatoxine *perfringens*. L'immunité anti-*perfringens* se développe (tableau IV). L'immu-

(4) D'après nos titrages *in vivo*, l'antitoxine *histolyticum* α existe rarement dans le sérum normal des chevaux ; lorsqu'elle est présente dans un tel sérum, ce n'est qu'à l'état de traces infimes [7].

(5) Le cheval reçoit successivement 20, 40, 70, 100 ml de toxine entre le 27 octobre et le 6 novembre 1952, puis, 50, 75, 100, 150 ml au cours des mois suivants. Titre de la toxine *septicum* injectée : 150 DM par millilitre (titrages sur souris, veines).

nité anti-histolyticum α et β baisse : le sérum prélevé deux cent dix-sept jours après la dernière injection d'anatoxine histolytique contient entre 1 et 2 UI anti-hist. α et 1 500 up anti- β ; le sérum prélevé deux cent quarante-neuf jours après la fin de la première immunisation titre 0,25 à 0,5 UI anti-hist. α et 800 up anti- β . Donc sept à huit mois après l'arrêt des injections d'anatoxine histolytique à un animal qui a produit peu d'antitoxine histolyticum α et beaucoup d'anti-collagénase β au cours de l'immunisation spécifique, on décèle encore dans le sang circulant des traces notables d'antitoxine α et un taux très important d'antitoxine β . Ce taux d'antitoxine β est bien supérieur à celui qui existe dans les sérums prélevés aux chevaux 881 et 384 sept et huit mois après l'arrêt de l'immunisation active anti-histolyticum.

TABLEAU IV. — Activité antitoxique du sérum du cheval 1102 successivement préparé contre *Cl. histolyticum* (première immunisation), *W. perfringens* (deuxième immunisation) et *Cl. septicum* (troisième immunisation).

Antigènes injectés	Sérum récolté le.	Temps écoulé	Titre anti- septicum UI	Pouvoir anti-histolyticum			Titre anti- perfringens			
				anti- α UI	anti- β up	après un délai de	anti- α UI	anti- β up		
histolyticum	3-X 16-I	-52 -53	(3 mois)		10-25 10	14000		0,25 10		
	perfringens	24-II 24-IV 14-VIII	-53 -53 -53	(34 jours) (204 jours)	2 1 à 2	8000 4000 1500	[47 jours] [217 jours]	100-125 100 125-150	500-1000 3000	
septicum		11-IX 14-IX 18-IX 24-IX I-X 30-X 27-XI 24-XII	-53 -53 -53 -53 -53 -53 -53 -53	(15 jours) (18 jours) (22 jours) (28 jours) (35 jours) (64 jours) (91 jours) (4 mois)	< 0,5 < 0,5 0,5-1 100-125 175 75-100 60-70 250-300	< 0,5 0,25-0,5 0,5-1 400-450 800-900 200 125-150 150-200	800 800 400 250 250	[249 jours] [253 jours] [259 jours] [265 jours] [295 jours] [322 jours] [350 jours]	30-40 5-10 5 2 à 5	100

Entre parenthèses : intervalle de temps entre la première injection de l'antigène considéré et la récolte du sérum titré.

Entre crochets : temps écoulé entre la dernière injection des antigènes de *Cl. histolyticum* et la récolte du sérum titré.

UI, unités internationales ; up, unités provisoires.

Lorsque les injections d'anatoxine *perfringens* sont supprimées pour leur substituer des injections d'antigènes septicum (6), le degré d'immunité anti-histolyticum α du cheval 1102 devient alors

(6) Doses inoculées : 175 ml d'anatoxine septicum en neuf jours, 490 ml de toxine septicum les quatorze jours suivants, puis 375 ml de cette toxine les mois ultérieurs (toxine contenant 150 à 200 DM par millilitre, souris, veines).

brusquement considérable : en effet, le sérum prélevé vingt-deux jours après la première injection d'antigènes *septicum* titre seulement 0,5 à 1 UI anti-*hist. a*. Le sérum prélevé *six jours plus tard* titre 400 à 450 UI anti-*hist. a* et celui qui est récolté sept jours après : 800 à 900 UI (tableau IV). Cette forte activité antitoxique des sérums offre un contraste frappant avec la faible réponse anti-*histolyticum a* provoquée par la première immunisation. Pendant que ce phénomène saisissant évolue, le taux de l'anticollagénase β diminue dans le sang circulant. Notons toutefois que le titre anti-collagénasique β du sérum prélevé 322 jours après la dernière injection d'anatoxine histolytique atteint encore la valeur relativement élevée de 250 up. Rappelons que ce cheval avait initialement engendré cette anti-collagénase à un taux important.

La détermination du titre anti-*perfringens a* des sérums de ce même cheval indique que l'immunité anti-*perfringens a* subit une chute brusque pendant le mois qui suit l'arrêt des injections d'anatoxine *perfringens*, puis une diminution modérée pendant les deux et trois mois suivants (tableau IV). La teneur en anti-hémolysine θ diminue aussi : après la dernière injection d'anatoxine *perfringens*, le sérum du cheval titre 200 à 250 UI anti- θ ; deux mois plus tard : 50 UI et pendant les deux mois suivants : 20 à 30 UI.

II. Chevaux ayant produit beaucoup d'antitoxine *histolyticum a* pendant l'immunisation spécifique. Injections ultérieures d'anatoxine *perfringens*. Résultats.

L'immunisation anti-*histolyticum* de 5 chevaux est poursuivie pendant quinze à vingt-cinq mois, puis les animaux reçoivent des injections d'anatoxine *perfringens*. L'intervalle entre la dernière inoculation d'anatoxine histolytique et la première injection d'anatoxine *perfringens* est de trente-deux ou quarante-cinq jours. Trois chevaux, respectivement numérotés 1008, 1041, 1045, produisent peu d'antitoxine *perfringens a* pendant la deuxième immunisation dont la durée est limitée à trois mois en raison de son peu d'efficacité. Les deux autres chevaux, portant les numéros 1084 et 1011, élaborent des quantités moyennes d'antitoxine *perfringens a*. L'immunisation anti-*perfringens* du cheval 1084 est prolongée pendant six mois, celle du cheval 1011 pendant vingt-sept mois et demi. Voici les titres de quelques sérums.

a) La deuxième immunisation est maintenue pendant quelques mois seulement chez les animaux faibles producteurs d'antitoxine *perfringens a*.

Cheval 1008. — Durée de la première immunisation : quinze mois ; titre maximum anti-*histolyticum a* observé pendant cette immuni-

sation : 1 200 à 1 500 UI. Le sérum prélevé à la fin de cette immunisation titre 1 000 UI anti-*hist. α*. Après l'arrêt de la première immunisation, l'immunité anti-*histolyticum α* diminue très vite (fig. 1). Pendant la deuxième immunisation, le titre maximum anti-*perfringens α* du sérum du cheval atteint seulement 20 à 30 UI.

Cheval 1041. — Durée de la première immunisation : quinze mois ; titre maximum anti-*histolyticum α* observé : 1 000 à 1 200 UI. A la

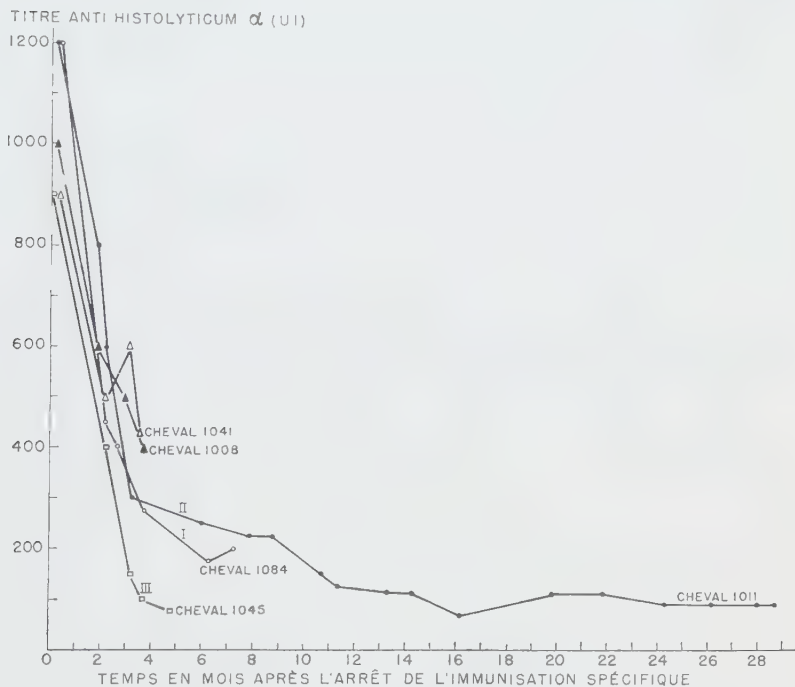


FIG. 1. — Titre anti-*histolyticum α* des sérums successivement prélevés à cinq chevaux à partir du moment où l'immunisation spécifique est interrompue. Après l'arrêt de cette immunisation, les chevaux sont préparés contre les antigènes *perfringens* et soumis à deux saignées mensuelles de 6 à 7 litres chacune. UI, unités internationales.

fin de cette immunisation, le sérum du cheval titre 900 UI. Quatre mois après l'arrêt de cette immunisation, le sérum du cheval titre 425 UI anti-*hist. α*. Le titre maximum anti-*perfringens α* des sérums récoltés pendant la deuxième immunisation est seulement compris entre 30 et 40 UI.

Cheval 1045. — La première immunisation est maintenue pendant vingt-deux mois ; le titre maximum enregistré est de 1 000 UI anti-*hist. α* ; à la fin de l'immunisation, le sérum du cheval titre 900 UI

anti-hist. α ; le sérum prélevé quatre mois et demi plus tard contient 90 UI anti-hist. α (fig. 1, courbe III). Sous l'impulsion des injections d'anatoxine *perfringens*, le cheval élabore des anticorps anti-*perfringens* : titre maximum anti-*perfringens* α : 30 à 40 UI.

De ces trois exemples il ressort que certains chevaux ayant élaboré un taux important d'antitoxine *histolyticum* α pendant quinze à vingt-deux mois, sont ensuite incapables de produire beaucoup d'antitoxine *perfringens* α .

b) La deuxième immunisation est maintenue longtemps chez les chevaux capables d'élaborer des quantités moyennes d'antitoxine *perfringens* α .

Cheval 1084. Durée de la première immunisation : vingt-deux mois ; titres maxima notés pendant cette immunisation : 1 600 à 1 800 UI anti-hist. α et 12 000 up anti- β . Le sérum prélevé à la fin de cette immunisation titre 1 200 UI anti-hist. α et 10 000 up anti- β .

TABLEAU V. — **Activité antitoxique du sérum des chevaux 1084 et 1011 préparés successivement contre les antigènes de *Cl. histolyticum* (première immunisation) puis contre ceux de *W. perfringens* (deuxième immunisation).**

Antigènes injectés	Sérum récolté le:	Temps écoulé	Pouvoir anti- histolyticum			Titre anti-perfringens	
			anti- α UI	anti- β up	après un délai de	anti- α UI	anti- β up
Immunisation du cheval 1084							
histolyticum	7-VII -53	(14 mois)	1200-1500				
	20-XI -53	(19 mois)	1000-1200				
	29-I -54	(21 mois)	1600-1800	12000			40
	5-III -54	(23 mois)	1200	10000		0,25 à 0,5	
perfringens	29-IV -54	(24 jours)	400-500		[67 jours]	175-200	
	11-VI -54	(67 jours)	250-300	4000	[110 jours]	200-250	
	6-X -54	(184 jours)	200	3000	[227 jours]	75	3000-4000
Immunisation du cheval 1011							
histolyticum	5-II -54	(27 mois 1/2)	1600-1800	15000		<0,25	
	12-III -54		1200				10
perfringens	29-IV -54	(24 jours)	800		[56 jours]	100	
	10-V -54	(35 jours)	600	4000	[67 jours]	150	400
	11-VI -54	(67 jours)	300		[99 jours]	150-175	
	3-IX -54	(151 jours)	200-250	3000	[183 jours]	250	600
	29-X -54	(207 jours)	200-250		[239 jours]	450-500	
	18-II -55	(319 jours)	125	3000	[351 jours]	250-300	700
	22-XII -55	(624 jours)	100-125	2000	[656 jours]	350-400	400-600
	13-III -56	(707 jours)	85-100		[739 jours]	225-250	
	11-V -56	(766 jours)	85-100	1600	[798 jours]	350-400	700
	6-VII -56	(27 mois)	85-100	1600	[28 mois]	200-225	350
	21-VII -56	(27m, 15 j.)	85-100		[28m, 15j.]	150-175	

Entre parenthèses : intervalle de temps entre la première injection de l'antigène considéré et la récolte du sérum titré.

Entre crochets : temps écoulé entre la dernière injection des antigènes de *Cl. histolyticum* et la récolte du sérum titré.

UI, unités internationales ; up, unités provisoires ; m., mois ; j., jours.

Deux mois après la première injection d'anatoxine *perfringens* (deuxième immunisation), le sérum du cheval possède un titre anti-*perfringens* α moyen : 200-250 UI ; il contient beaucoup moins d'anticorps anti-*histolyticum* α que les sérums des mois précédents. Le sérum prélevé deux cent vingt-sept jours après la dernière injection d'anatoxine *histolyticum* titre seulement 200 UI anti-*hist.* α et 3 000 up anti- β (tableau V). La courbe 1 de la figure 1 schématise l'atténuation rapide de l'immunité anti-*histo-*

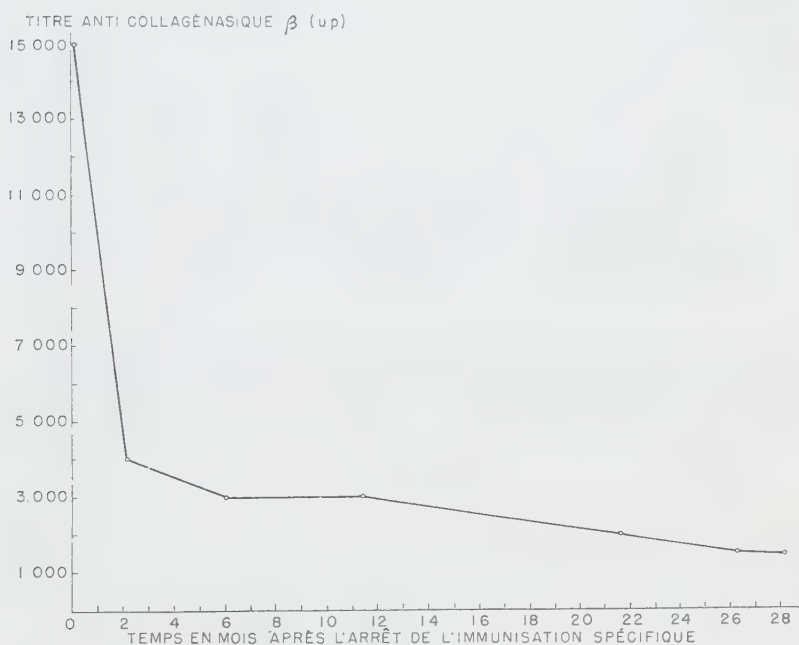


FIG. 2. — Teneur en anti-collagénase β des sérums successivement prélevés au cheval 1011 après la dernière injection d'antigène *histolyticum*. Après l'arrêt de l'immunisation spécifique, le cheval 1011 reçoit des injections d'antigènes *perfringens* et il est saigné de 12 à 14 litres par mois.
up, unités provisoires.

lyticum α du cheval 1084 après l'arrêt des injections d'antigènes *histolyticum*.

Attirons l'attention sur le fait que deux cent vingt-sept jours après l'arrêt de la première immunisation le titre anti- β du sérum du cheval 1084, de même que celui des sérums fournis pendant vingt-deux mois par le cheval 1011 après cette immunisation, est supérieur au titre anti- β du sérum prélevé au cheval 1102 sept mois après la fin de la même immunisation. Ceci résulte vraisemblablement

blement de ce que les chevaux 1084 et 1011 ont reçu beaucoup plus d'injections d'antigènes *histolyticum* que le cheval 1102.

Cheval 1011. Ce cheval est soumis pendant vingt-six mois et demi à des injections d'antigènes *histolyticum* et aux saignées coutumières ; il produit beaucoup d'antitoxines *histolyticum* α et β puisque les titres maxima observés au cours de cette immunisation atteignent 1 600 à 1 800 UI anti-*hist.* α et 15 000 up anti- β . Le cheval reçoit ensuite pendant vingt-sept mois et demi des injections d'anatoxine *perfringens* et il est saigné de 6 à 7 l deux fois par mois. Chaque sérum est titré. Le tableau V, la courbe 2 de la figure 1 et la courbe de la figure 2 indiquent la chute rapide des antitoxines *histolyticum* α et β pendant la deuxième immunisation, puis leur diminution de plus en plus lente et leur *stabilisation* à un niveau relativement important : les sérums prélevés trois mois et un an après la fin de la première immunisation contiennent respectivement 300 et 125 UI anti-*hist.* α . Le sérum récolté vingt-huit mois après la dernière injection d'anatoxine histolytique titre 85 à 100 UI anti-*hist.* α et 1 600 up anti- β .

Les sérums les plus riches en anticorps anti-*perfringens* pendant la deuxième immunisation contiennent 450 à 500 UI anti-*perfringens* α et 700 up anti-K (tableau V). Ces valeurs attestent l'efficacité des injections d'anatoxine *perfringens* au cheval considéré.

Discussion.

En 1921, Glenny et Südmersen [8] signalent que la toxine diphtérique injectée à des animaux antérieurement immunisés avec ce même antigène fait très vite apparaître un taux élevé d'antitoxine diphtérique dans le sérum sanguin.

Glenny, Pope, Waddington et Wallace (1925) notent que les chevaux laissés au repos pendant un mois après avoir reçu quelques injections d'antigène tétanique réagissent ensuite rapidement et intensément à de nouvelles injections d'antigène tétanique [9].

D'après Ramon et ses collaborateurs [11], Lemétayer, Nicol et Girard [12], les chevaux préalablement vaccinés contre le tétanos puis ultérieurement utilisés pour la préparation du sérum anti-tétanique produisent un taux d'antitoxine bien supérieur à celui des chevaux non vaccinés.

La modification produite chez un animal par les premières injections d'un antigène confère donc à cet animal une aptitude particulière à produire l'anticorps correspondant. Une telle notion peut-elle servir indirectement à l'étude d'une propriété anti-

génique peu connue de la toxine *septicum* ? Depuis 1946, nous avons régulièrement remarqué que l'action létale de la toxine histolytique est supprimée par le sérum des chevaux ayant reçu de nombreuses injections de toxine *septicum* [43]. Ce fait et les résultats que nous avons observés en titrant le sérum des chevaux successivement immunisés contre les antigènes de *Cl. histolyticum*, puis contre ceux de *Cl. septicum* nous ont conduites à supposer que la toxine *septicum* doit contenir en quantité appréciable l'antigène létal et nécrosant α qui existe à l'état dominant dans la toxine histolytique. Nos expériences sur chevaux soumis à ces immunisations consécutives montrent que si des injections d'anatoxine histolytique, répétées pendant quelques mois, ne déclenchent qu'une faible production d'antitoxine *histolyticum* α chez certains chevaux (première immunisation), les injections de toxine *septicum* faites ensuite à ces chevaux déterminent généralement un accroissement de l'immunité anti-*histolyticum* α : lorsque les antigènes de *Cl. septicum* sont administrés dix-huit à vingt et un jours après la dernière injection d'anatoxine histolytique, le pouvoir anti-*histolyticum* α des sérums récoltés au cours de la deuxième immunisation des chevaux réceptifs devient *progressivement* plus élevé que celui des sérums titrés pendant la première (tableaux II et III) : si on laisse un long intervalle (sept mois ou quarante-six mois) entre l'arrêt de la première immunisation et le début des injections de toxine *septicum*, le pouvoir anti-*histolyticum* du sérum subit une très forte augmentation *peu de temps* après l'inoculation de la toxine *septicum* : les saignées d'épreuve faites au cheval 1102 les quinzième, dix-huitième, vingt-deuxième et vingt-huitième jours après la première injection de cette toxine révèlent que l'accroissement brutal du pouvoir antitoxique du sang circulant est précédé d'une phase latente de vingt-deux jours environ ; en effet, entre le vingt-deuxième et le vingt-huitième jour qui suit la première injection des antigènes de *Cl. septicum*, le titre du sérum du cheval s'élève de 0,5 UI anti-hist. α à 400-450 ; pendant le même temps, le titre anti-*septicum* passe de 0,5 UI à 100-125 (tableau IV). L'immunité anti-*histolyticum* α du cheval atteint son maximum la semaine suivante.

La réponse antitoxique du cheval 384 aux injections de toxine *septicum* (quatrième immunisation) est plus précoce que celle du cheval 1102 puisque la phase latente chez le cheval 384 est inférieure à dix-huit jours.

Il serait intéressant de rechercher la durée de la phase de latence en fonction des conditions expérimentales. Il faudrait, par exemple, immuniser plusieurs séries de chevaux contre les antigènes de *Cl. histolyticum* ; puis ne faire ni soustractions sanguines importantes ni

inoculations aux animaux pendant six mois à quatre ans. Après ces périodes de repos, injecter de la toxine *septicum* à la moitié des chevaux et des antigènes *histolyticum* à l'autre moitié ; prélever fréquemment du sérum aux chevaux pour voir au bout de combien de temps la production massive des anticorps s'amorce chez les différents animaux. Il est probable que le degré d'immunité du cheval au moment de la reprise des injections et les doses d'antigènes injectées influencent la rapidité et l'intensité de la réponse des cellules productrices d'anticorps.

Si nous faisons le rapport des titres anti-*histolyticum* α et anti-*septicum* du sérum des chevaux ayant reçu des injections d'anatoxine histolytique puis de toxine *septicum*, nous voyons que ces chevaux fournissent pendant des temps variables un sérum dont le titre anti-*histolyticum* α déterminé *in vivo* est supérieur au titre anti-*septicum* (7) ; d'autre part, les titrages *in vitro* indiquent que le sérum de ces chevaux contient de l'anti-collagénase *histolyticum* β . Reconnaissons toutefois que le titre anti- β du sérum récolté longtemps après le début de l'immunisation anti-*septicum* est très faible lorsque le cheval a élaboré relativement peu d'anti-collagénase β pendant l'immunisation anti-*histolyticum*. D'après nos observations antérieures [13], les chevaux soumis pendant longtemps à une seule immunisation — uniquement à des injections répétées de toxine *septicum* pendant quatre à cinquante mois — procurent un sérum qui manifeste un titre anti-*histolyticum* α inférieur au titre anti-*septicum* ; ce sérum ne contient pas un taux décelable d'anti-collagénase β . Les différences qui existent entre les deux sortes de sérums à la fois anti-*histolyticum* α et anti-*septicum* que nous comparons montrent que l'on peut indirectement détecter la persistance des modifications intracellulaires qui ont été provoquées par l'anatoxine histolytique initialement injectée à des chevaux.

Résumé.

Différents chevaux sont immunisés d'abord contre les antigènes de *Cl. histolyticum* (première immunisation), puis contre ceux de *Cl. septicum*, *W. perfringens* ou *Cl. œdematiens* ; ils sont saignés au rythme indiqué. Les titres anti-*histolyticum* α , anti-*septicum*, anti-*perfringens* α , anti-*œdematiens* sont déterminés en présence de toxines précipitées par le sulfate neutre d'ammonium ; le pouvoir anti-collagénasique α des sérums est recherché vis-à-vis de la même préparation de toxine histolytique liquide.

(7) Le cheval 1102 fournit un tel sérum pendant trois mois ; le cheval 384 pendant plus de huit mois au cours de la quatrième immunisation.

Les antigènes de *Cl. septicum* sont injectés seulement aux chevaux ayant produit peu d'antitoxine *histolyticum* α pendant la durée de la première immunisation (deux à six mois) ; lorsque les injections de toxine *septicum* à ces chevaux sont commencées sept mois ou quarante-six mois après la fin de la première immunisation, elles suscitent en quelques semaines un accroissement considérable du titre anti-*histolyticum* α du sang circulant (tableaux III et IV) : le rapport entre le titre anti-*histolyticum* α et le titre anti-*septicum* des sérums alors récoltés est supérieur à 1.

Les inoculations d'anatoxine *perfringens* (deuxième immunisation) à des chevaux préalablement hyperimmunisés pendant quinze à vingt-six mois contre *Cl. histolyticum* déclenchent la formation de quantités variables d'anticorps anti-*perfringens*. Pendant que l'immunité anti-*perfringens* évolue, l'immunité anti-*histolyticum* α des chevaux régresse, d'abord rapidement ensuite faiblement, puis tend finalement à se stabiliser à un niveau relativement important (tableau V, figure 1, courbe 2) en l'absence de toute injection d'antigènes *histolyticum* et malgré les saignées mensuelles pendant la deuxième immunisation.

Les déterminations du titre anti-collagénasique β des sérums successivement prélevés aux chevaux pendant plusieurs immunisations consécutives montrent que le taux de l'anti-collagénase β dans le sang circulant diminue fortement pendant les six premiers mois qui suivent l'arrêt des injections d'anatoxine histolytique et de plus en plus lentement par la suite ; l'intensité de l'immunité résiduelle anti- β est d'autant plus marquée que les animaux ont davantage produit d'anti-collagénase β pendant l'immunisation spécifique.

SUMMARY

PROPERTIES OF SERA FROM HORSES SUBMITTED TO A SERIES OF IMMUNIZATIONS AND BLEEDINGS.

PERSISTANCE OF THE EFFECT PRODUCED BY THE FIRST ANTIGENS.

Different horses are first immunized against *Cl. histolyticum* antigens (first immunization), then against those of *Cl. septicum*, *W. perfringens* or *Cl. oedematiens*.

Injections of *septicum* toxin are given exclusively to horses which have produced very little *histolyticum* α antitoxin during the first immunization. If these injections start 7 months or 46 months after the end of the first immunization, they provoke in a few weeks a sharp increase of the anti-*histolyticum* α titre : the anti-*histolyticum* α titre is then higher than the anti-*septicum* titre.

Horses which have produced much *histolyticum* α antitoxin during this first immunization (15 to 26 months) receive afterwards injections of *perfringens* anatoxin. During this second immunization, the titre of *histolyticum* α antitoxin decreases in the blood, first considerably, then slowly (see fig. 1, curve 2).

Determinations of the anti-collagenase β titre of the horse sera during several successive immunizations, show that the anti-collagenase β titre strongly decreases during the first six months after the *histolyticum* anatoxin injections have been stopped and more and more slowly afterwards. The intensity of residual anti- β immunity is all the more pronounced as the horses have produced more anti-collagenase β during the specific immunization.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARR (M.) et GLENNY (A. T.). *Lancet*, 1947, **2**, 647.
- [2] SÉDALLIAN (P.), BERGER (M.) et CARRAZ (M.). *Rev. Immunol.*, 1952, **16**, 390.
- [3] GUILLAUMIE (M.). a) *Ann. Inst. Pasteur*, 1941, **67**, 112 et 389 ; 1942, **68**, 202 ; b) GUILLAUMIE (M.), KRÉGUER (A.), FABRE (M.) et BÉCOULET (G.). *Rev. Immunol.*, 1952, **16**, 257.
- [4] GUILLAUMIE (M.), MRČEVITCH (S.), DELAUNAY (M.) et BÉCOULET (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **78**, 190 et 201.
- [5] NAGEOTTE (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 559.
- [6] DELAUNAY (M.), GUILLAUMIE (M.) et DELAUNAY (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **76**, 16.
- [7] GUILLAUMIE (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 69.
- [8] GLENNY (A. T.) et SÜDMERSEN (A. J.). *J. Hyg.*, 1921, **20**, 176.
- [9] GLENNY (A. T.), POPE (G.), WADDINGTON (H.) et WALLACE (U.). *J. Path. Bact.*, 1925, **28**, 463.
- [10] DESCOMBEY (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **94**, 315 ; *Ann. Inst. Pasteur*, 1930, **95**, 373.
- [11] RAMON (G.), DESCOMBEY (P.) et LEMÉTAYER (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1931, **96**, 444. — RAMON (G.), LEMÉTAYER (E.) et MUSTAFA (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 895.
- [12] LEMÉTAYER (E.), NICOL (L.) et GIRARD (O.). *Bull. Acad. Vétér.*, 1945, **18**, 247.
- [13] GUILLAUMIE (M.), KRÉGUER (A.) et FABRE (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **72**, 814 et 818 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 436 ; *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 38.

ÉTUDE DES FORMES L DES BACTÉRIES

APPARUES SPONTANÉMENT *IN VIVO*

III. HISTOPATHOLOGIE COMPARÉE DES LÉSIONS PROVOQUÉES PAR LA BACTÉRIE NORMALE ET PAR SES FORMES MODIFIÉES.

par G. HANNOUN, J. VIGOUROUX, J. LEVADITI et O. NAZIMOFF. (*)

(Institut Pasteur, Service de M. R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE
[Laboratoire de M^{lle} CATEIGNE],
et Service d'Anatomie Pathologique)

Dans deux travaux précédents [6, 7] nous avons décrit les propriétés de formes L et de formes granulaires de *Streptococcus viridans* (var. Sbe, *sanguis*) obtenues *in vivo*. Nous en avons étudié en détail le pouvoir pathogène pour l'embryon de poulet, le poussin et le lapin et des expériences de contrôle ont été réalisées avec la forme normale de *St. sanguis* ou avec d'autres bactéries pathogènes, de façon à préciser les particularités de la maladie expérimentale. Nous en décrirons ici les principaux aspects histopathologiques et verrons en quoi leur connaissance aide à résoudre certains des problèmes posés par ces formes L et granulaires.

POUVOIR PATHOGÈNE POUR L'EMBRYON DE POULET.

1° STREPTOCOQUE SOUS SA FORME NORMALE. — a) *Inoculation sur la membrane chorio-allantoïque.* — Macroscopiquement, la membrane présente, après vingt-quatre heures d'incubation, de petites hémorragies disséminées. Ces pétéchies s'étendent, la membrane pâlit, s'épaissit par l'œdème et les vaisseaux, devenus exsangues, s'amincissent et deviennent grisâtres.

L'examen microscopique de cette membrane montre que l'épaississement est dû : à l'œdème interstitiel, à une pluristratification de l'épithélium de surface et à la multiplication des cellules mésenchymateuses. Certains vaisseaux sont thrombosés, d'autres entourés de suffusions sanguines avec hémolyse. Après coloration de Gram, on voit, dans tout le système vasculaire et aussi

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 octobre 1956.

dans les tissus, des germes dispersés, parfois intracellulaires avec deux aspects distincts : soit de germes en voie de lyse dans des cellules d'apparence saine, soit de germes d'apparence normale dans des cellules altérées, évoquant l'un la phagocytose, l'autre la multiplication intracellulaire.

L'embryon est congestif et même hémorragique. Des pétéchies sont diffusées ou localisées et alors prédominent dans certaines régions : flancs, membres, partie médiane et postérieure de la tête et du cou, dans la zone où se formera la crête.

L'examen histologique montre essentiellement une intense inflammation vasculo-sanguine. Que ce soit dans le tissu conjonctif interstitiel des organes ou sous l'épiderme, on constate une dilatation considérable des vaisseaux, entourés parfois de petites suffusions hémorragiques avec des images d'érythrodiapédèse caractéristiques. Les cellules mésenchymateuses paraissent intactes, il n'existe pas d'amas leucocytaires. Le foie, le cœur et surtout les reins sont altérés, avec, comme lésion majeure, l'atteinte vasculaire. Le péricarde est parfois œdémateux ; dans le myocarde on constate de la congestion et un œdème interstitiel ; dans l'endocarde, en plus d'un œdème sous-endocardique, on voit, dans l'endothélium, d'abondants nids de germes, parfois atypiques. Dans les reins on constate, outre une hyperémie diffuse, des lésions glomérulaires : le flocculus est plus gros, sa densité cellulaire est augmentée, l'espace glomérulo-capsulaire est diminué et on y rencontre des globules rouges et des débris cellulaires (1).

Contrairement aux aspects observés dans la membrane, il n'y a pas, dans l'embryon, de germes intracellulaires. Les germes rencontrés dans les divers organes et dans les vaisseaux sont parfois typiques, en diplocoques ou en chaînettes, d'autres fois leur morphologie est altérée, ils sont diptérimorphes.

b) *Inoculation dans le sac vitellin.* — A l'examen macroscopique, les membranes chorio-allantoïque et vitelline ne sont pas altérées. L'embryon présente les mêmes lésions qu'après inoculation sur la membrane chorio-allantoïque, mais avec une plus grande intensité. Dans un cas où nous avons trouvé une hémorragie sous-cutanée située à la base du cou, il s'agissait d'un hématome mesurant environ 2 mm de diamètre. La ponction a permis d'en retirer du sang qui,ensemencé sur bouillon glucosé, a donné en vingt-quatre heures à l'étuve, une culture du streptocoque utilisé.

(1) A l'examen d'embryons ayant, en plus, reçu de la cortisone, nous avons trouvé une glomérulite aiguë, avec de l'œdème et des hémorragies interstitielles. Dans ce cas, le tissu mésenchymateux est également altéré.

2° FORMES INTERMÉDIAIRES (2). — a) *Inoculation dans le sac vitellin de sang de lapin* contenant des formes modifiées et quelques germes normaux. Comme nous l'avons dit dans la note consacrée à ces expériences [4], quelques-uns des embryons meurent avant quarante-huit heures ; dans ces cas, la culture de leur liquide vitellin est positive et on y retrouve le *Streptococcus sanguis* sous sa forme normale. Il s'agit là d'embryons qui avaient certainement reçu un ou plusieurs germes non modifiés et leurs lésions sont identiques à celles d'embryons inoculés dans les mêmes conditions avec la culture normale.

D'autres embryons meurent quatre jours ou plus après l'inoculation et seul l'examen microscopique révèle la présence des mêmes lésions, mais plus discrètes, et de quelques germes, d'apparence d'ailleurs atypique. Enfin, chez quelques-uns des embryons survivants et sacrifiés après sept jours, ces mêmes lésions peuvent être observées, mais toujours plus atténuées et peu étendues. Sur les lames colorées par la méthode de Gram, on voit dans les vaisseaux de plusieurs organes, mais essentiellement dans une grosse veine voisine du foie, vraisemblablement la veine cave, des éléments Gram positifs polymorphes allant de la granulation ronde à la limite de la visibilité, aux diplocoques typiques. Ces éléments sont groupés par deux ou en amas, ou en longues chaînettes d'aspect caractéristique, alignés le long d'une sorte de filament ou de réseau (sans doute de la fibrine). Les divers éléments de la chaînette sont le plus souvent de tailles différentes, restent distants les uns des autres, mais semblent reliés entre eux par le long filament qui les supporte.

Nous pensons, pour les raisons suivantes, que ces éléments atypiques sont des formes bactériennes altérées.

Ils prennent fortement le Gram, alors que la coloration à l'hémalun-éosine ne fait apparaître que le support.

On ne rencontre pas d'aspects comparables dans les préparations témoins.

Leur disposition en chaînettes rappelle celle du germe dont ils proviennent.

Ils sont morphologiquement identiques à ceux observés dans les cultures *in vitro* de germes modifiés.

Enfin, dans leur voisinage, on peut observer des diplocoques typiques.

On ne saurait cependant sous-estimer l'influence de la fixation et des colorations histologiques sur l'aspect d'éléments aussi ténus et fragiles que sont certaines des formes que nous étudions.

(2) Les formes intermédiaires de *S. sanguis* sont des formes modifiées obtenues par passage sur le lapin et l'embryon de poulet [4] puis cultivées *in vitro* [6].

Les images les plus nettes et les plus fidèles ont toujours été obtenues sur frottis colorés et non sur coupes histologiques.

b) *Inoculation dans le sac vitellin de cultures de formes intermédiaires.* — Les cultures de formes intermédiaires provoquent des lésions modérées, consistant essentiellement en suffusions hémorragiques disséminées, au niveau desquelles on voit de nombreuses formes bactériennes normales ou modifiées. Les lésions sont en tous points comparables à celles que nous venons de décrire.

3° FORMES GRANULAIRES (ultraphytes). — Les formes granulaires provenaient de deux sources : de la transformation spontanées de streptocoques *in vivo* et de la transformation provoquée *in vitro* [7]. Inoculées sur la membrane chorio-allantoïque, elles tuent environ un embryon sur deux. Les embryons morts et la plupart des survivants, sacrifiés après sept jours, présentent des lésions discrètes de caractère hémorragique.

Les frottis de membrane chorio-allantoïque colorés au Giemsa montrent de grandes cellules en caryorhexis à protoplasme vacuolaire et qui contiennent quelques granules d'interprétation difficile. Au Gram, on voit d'abondantes granulations Gram-positives en amas ou parfois dispersées. Elles peuvent être fixées à la surface des hématies ou incluses dans des cellules mésenchymateuses mobilisées. Les images de couronnes de granules entourant les hématies rappellent exactement certaines images d'hématies entourées par des cocci normaux.

Les coupes histologiques des embryons correspondants révèlent des lésions discrètes réduites à quelques suffusions sanguines sous-cutanées. Dans les ébauches rénales, on peut observer l'apparition de collagène dans quelques anses capillaires des glomérules, alors que le tissu interstitiel voisin est intact. La coloration de Gram fait apparaître dans les vaisseaux des divers organes, et au voisinage de l'endocarde, des granules analogues à ceux décrits plus haut. On distingue, sur les préparations colorées à l'hémalun-éosine, des éléments morphologiquement comparables aux corps globuleux, mais les conditions de fixation ne permettent pas d'affirmer leur nature.

Dans un travail précédent, nous avons décrit [7] l'expérience qui nous permet d'obtenir un poussin à partir d'un œuf inoculé après six jours d'incubation avec une souche de granules stabilisés. Ce poussin fut sacrifié cinquante-deux jours après l'inoculation car il était porteur d'une tuméfaction de la partie inférieure du bec.

Cette tuméfaction de 3 à 4 mm de diamètre était dure, nécrosée, hémorragique, mal limitée, et se situait dans le tissu conjonctif lâche du plancher de la cavité buccale, non limitée, infiltrant

les glandes salivaires et les muscles voisins. Ce foyer sous-muqueux d'inflammation exsudative à polynucléaires peut provenir de l'inflammation des glandes péri-bucco-pharyngées ou d'une inflammation primitive du conjonctif ainsi que le laisse supposer la présence presque constante de granules à cet endroit chez les embryons inoculés. La lésion contient de nombreux granules Gram positifs, quelques-uns ayant la taille d'un germe normal. Les cultures du broyat de la tuméfaction et du foie ont été positives et le germe fut alors identifié sérologiquement comme le *S. sanguis* d'où provenaient les granules.

Les granules inoculés furent donc capables d'évoluer dans l'embryon sans le tuer jusqu'à l'éclosion, puis sont restés latents chez le poussin apparemment normal, jusqu'à un moment où l'évolution devint soudain rapide, le germe normal ayant réapparu.

4° AUTRES GERMES PATHOGÈNES. — a) *Staphylocoque doré hémolytique*. — Les embryons inoculés sur la membrane chorio-allantoïque avec une souche de staphylocoque pathogène meurent en quarante-huit heures, en présentant des lésions d'opacification des membranes chorio-allantoïque ou amniotique et des hémorragies intenses visibles sur le corps de l'embryon.

Histologiquement, certaines plages de la membrane chorio-allantoïque sont amincies, nécrosées et la structure normale n'y est plus reconnaissable. Dans d'autres zones, on observe une prolifération mésenchymateuse, de la congestion et de petites suffusions sanguines. L'épithélium de surface est intact ou hyperplasique, celui de profondeur est dans l'ensemble plus nécrotique. L'embryon présente des lésions vasculo-sanguines ainsi qu'une mobilisation des cellules conjonctives. On note de la nécrose et de l'œdème interstitiel. Les lésions rénales sont intenses : l'hyperémie s'accompagne de destruction des tubes dans la lumière desquels on voit des germes.

b) *H. influenzae*. — *H. influenzae* tue l'embryon en vingt-quatre heures avec épaissement de la membrane chorio-allantoïque et congestion de l'embryon. Les liquides allantoïques très riches en germes sont très troubles.

Histologiquement, on note une hyperplasie de l'épithélium et de l'endoderme et une intense inflammation vasculo-sanguine avec métamorphose importante des cellules mésenchymateuses. Le Dominici révèle des bacilles grêles dans les cellules sanguines et mésenchymateuses des membranes et de l'embryon.

c) *Embryons témoins ayant reçu de l'eau physiologique ou du bouillon stériles*. — Chez les embryons témoins, on ne peut signaler que quelques ectasies capillaires avec des hématies autour des vaisseaux de la membrane chorio-allantoïque prove-

nant du léger traumatisme subi au moment de l'inoculation et localisée à ce point. Le reste des enveloppes et l'embryon lui-même sont constamment intacts.

POUVOIR PATHOGENE POUR LE LAPIN DES FORMES MODIFIEES.

Alors que la forme normale de *Str. sanguis* n'est pas pathogène pour le lapin dans ces conditions, l'inoculation au lapin par voie sous-cutanée ou intradermique de suspension de germe en forme intermédiaire (B, C, D) provoque l'apparition d'un nodule inflammatoire qui s'indure par la suite. Le dixième jour, nous avons réalisé une biopsie de la lésion à fin d'examen histologique.

Dans les lésions provoquées par l'*injection sous-cutanée*, on constate la présence d'infiltrats histiocytaires péri-vasculaires dermiques et, en profondeur, une réaction macrophagique marginant une plage constituée de cellules rondes, nécrosées en voie de lyse totale au centre. C'est l'aspect d'un abcès récent déjà encerclé d'une réaction fibroblastique.

Dans les réactions à l'*injection intradermique*, on voit un tissu de granulation très dense avec amorce de réaction fibroblastique. Les fibres collagènes du derme sont dissociées par cette inflammation subaiguë à prédominance monocyttaire. On y voit des granules inégaux, Gram positifs extra- ou intracellulaires.

Ces résultats histologiques concordent assez bien avec ceux de Minck et Frühling [5].

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Les lésions produites par l'inoculation de *S. viridans sanguis* normal à l'embryon de poulet consistent en une inflammation vasculo-sanguine à peu près généralisée avec des lésions particulières dans la membrane chorio-allantoïque, le foie, le cœur et les reins (3). Elles sont différentes de celles produites par le staphylocoque ou *H. influenzae*. Les formes modifiées de *S. viridans sanguis*, ainsi que les formes granulaires de ce germe, donnent le même type de lésions parfois seulement avec une plus faible intensité. Il apparaît donc que la désintégration ou la dégradation bactériennes ne changent pas l'affinité tissulaire ou cellulaires des éléments auxquels elles aboutissent.

(3) Il est important de constater que lorsque l'on injecte quelques germes normaux, ils tuent l'embryon et gardent leurs propriétés et leur aspect primitifs sans avoir été modifiés par le séjour dans le liquide vitellin, pourtant riche en lysozyme.

Il existe cependant plusieurs différences :

a) Les lésions provoquées par ces formes modifiées ou granulaires sont plus atténuées, donnant l'impression d'une agression de plus faible intensité ;

b) Les altérations cellulaires diffèrent : les cellules vacuolaires et les hématies altérées étant l'apanage des formes granulaires ;

c) La bactérie normale ne provoque pas l'apparition de granules Gram positifs en chaînettes d'aspect caractéristique ;

d) Ces formes peuvent subsister à l'état latent et donner lieu, beaucoup plus tard, à un réveil évolutif aigu analogue à ceux que l'on rencontre dans certaines affections humaines (endocardites...) ;

e) Enfin, le pouvoir pathogène pour le lapin est une propriété nouvelle des formes modifiées.

La présence de germes et de granules intracellulaires apporte une confirmation aux travaux de Goodpasture et Anderson [3] qui voient dans ces aspects la preuve de la multiplication intracellulaire et de la diffusion du germe par les cellules du sang. Nous avons observé deux types de cellules pouvant correspondre les unes à la phagocytose, les autres à la multiplication intracellulaire. En tout état de cause, la phagocytose n'est pas la cause de la transformation bactérienne.

Des études déjà anciennes ont montré que l'on pouvait reproduire chez l'embryon de poulet, par inoculation de bactéries pathogènes, des lésions identiques à celles produites par le germe au cours de maladies humaines naturelles (glomérulo-néphrite à staphylocoque, méningite à *H. influenzae* [4], lésions pulmonaires à *H. pertussis* [2]). Dans le cas du *S. sanguis*, malgré les conditions et la durée de l'expérimentation, fort différentes de l'évolution de l'endocardite humaine, on peut remarquer la concordance et la localisation des lésions aux mêmes systèmes tissulaires (endothéliums vasculaires et cardiaques, glomérules rénaux). L'embryon de poulet représente donc un milieu vivant convenant à l'étude du biotropisme de germes habituellement saprophytes et des lésions qu'ils sont capables d'y produire.

RÉSUMÉ.

S. viridans sanguis inoculé à l'embryon de poulet par voie vitelline provoque l'apparition de lésions différentes de celles produites par l'inoculation d'autres bactéries pathogènes et caractérisées surtout par une atteinte des endothéliums vasculaires. Les formes modifiées et même granulaires de ce germe donnent le même type général de lésions, parfois avec une plus faible intensité. De plus, on note la présence de chaînettes de granules

Gram positifs d'aspect caractéristique dans certains vaisseaux et au sein de quelques tissus. Dans certaines conditions, les formes granulaires sont capables, après une longue période de latence, de déclencher l'apparition de lésions d'évolution rapide où l'on retrouve le germe sous sa forme normale.

SUMMARY

STUDY OF L FORMS SPONTANEOUSLY APPEARING *in vivo*.

III. COMPARATIVE PATHOLOGY OF THE LESIONS INDUCED
BY THE NORMAL BACTERIUM AND BY ITS MODIFIED FORMS.

S. viridans sanguis inoculated into the yolk sac of the chick embryo induces lesions very different from those provoked by other pathogenic bacteria and characterized especially by an alteration of the vascular endothelium. Modified, even granular forms of this germ cause the same general pattern of lesions, sometimes less severe. Moreover, chains of Gram-positive granules, with a typical aspect, are noticed in certain vessels and in some tissues. Under certain conditions, granular forms may, after a long lag period, provoke alterations with a rapid course ; in these alterations, the germ is found under its normal form.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GALLAVAN (M.). *Amer. J. Path.*, 1937, **43**, 911.
- [2] GALLAVAN (M.) et GOODPASTURE (E. W.). *Amer. J. Path.*, 1937, **43**, 927.
- [3] GOODPASTURE (E. W.) et ANDERSON (K.). *Amer. J. Path.*, 1937, **43**, 149.
- [4] HANNOUN (C.) et VIGOUROUX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 670.
- [5] MINCK (R.) et FRUHLING (L.). *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 2091.
- [6] VIGOUROUX (J.) et HANNOUN (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 912.
- [7] VIGOUROUX (J.) et HANNOUN (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 112.

LES MODIFICATIONS DES FONCTIONS ANTIGÈNE ET ANTICORPS DES PSEUDOGLOBULINES γ DU SÉRUM DE CHEVAL, SOUMISES A L'ACTION DES HAUTES PRESSIONS HYDROSTATIQUES

PREMIÈRE PARTIE

par P. CHAHBASI (*) (**).

(Institut Pasteur,
Services de Chimie Biologique et de Biochimie Cellulaire)

On sait depuis 1914 (Bridgman [40, 41]) qu'une pression hydrostatique suffisante, appliquée pendant un temps suffisant à des protéines en solution, provoque leur dénaturation.

Un nombre important de travaux a été consacré aux modifications de l'activité spécifique de certaines protéines : enzymes (Eyring, Johnson et Gensler [46]; Curl et Jansen [44]; Machebœuf et ses coll. [42, 26]), toxines [20], antigènes [21], anticorps (Machebœuf et Basset [5]; Boyd [7]; Bordet [6]), ou même aux modifications de la combinaison de l'antigène avec l'anticorps (Machebœuf, Barbu, Dubert, Slizewicz et Basset [2, 15]; Johnson et Campbell [42]). On a pu ainsi observer que la fonction anticorps de l'antitoxine tétanique [5] des agglutinines antityphoïdiques et des isoagglutinines de groupes sanguins [6] pouvait être détruite totalement ou partiellement par la pression. On a observé, d'autre part, que dans des solutions d'albumine de sérum de cheval, se formaient des agrégats moléculaires de dimensions variables (Barbu et Joly [4]).

Le présent travail utilise comme matériel d'études les pseudoglobulines γ du sérum de cheval. Dans la première partie sont étudiées les modifications apportées à la propriété antigénique et à la propriété anticorps. Dans la deuxième partie [43] nous étudions les modifications physico-chimiques subies par les mêmes protéines.

(*) Adresse actuelle : Institut Pasteur, Téhéran, Iran.

(**) Manuscrit reçu le 9 octobre 1956.

Matériel et méthodes.

PRÉPARATION DES PSEUDOGLOBULINES γ . — La préparation de cette fraction protéique a été faite au moyen du relargage par le sulfate d'ammonium entre 25 et 33 p. 100 de saturation. Le précipité obtenu est purifié par trois précipitations successives dans des conditions identiques. Le dernier précipité est dissous dans l'eau, puis dialysé contre l'eau bidistillée à 4° C jusqu'à élimination complète des sels. Pendant la dialyse une partie des protéines (euglobulines) précipite ; nous utilisons seulement la fraction restant en solution après dialyse.

La fraction pseudoglobulinique ainsi séparée, que nous désignons désormais par « γ Pg », correspond aux globulines des diagrammes électrophorétiques. Cette fraction est assez homogène à l'électrophorèse et très homogène à l'ultra-centrifugation [43], elle est très hydrophile, soluble dans l'eau en absence de sel, contient très peu de lipides (moins de 0,5 p. 100).

PRESSION (1). — La technique générale que nous avons utilisée a déjà été décrite [3, 4] ; nous donnerons seulement quelques précisions au sujet de la mise sous pression d'une solution de γ Pg : les solutions protéiques sont amenées au pH 8,3 par addition d'une quantité connue d'une solution N/10 de soude (2). La concentration finale en protéine est de 5 p. 100. Nous avons toujours comprimé les solutions en absence de tampon, afin d'éviter l'influence du sel qui pourrait avoir une action propre.

Des échantillons de 2 ml de ces solutions sont inclus dans des tubes de gomme afin d'être soumis aux pressions, alors que les témoins sont conservés à la pression atmosphérique. Chaque tube autre que le témoin est placé dans la presse hydraulique, puis comprimé à une pression connue comprise entre 2 000 et 12 000 kg/cm², pendant trente minutes à la température constante de 37° C.

IMMUNISATION. — Les solutions d'antigènes utilisées sont des solutions aqueuses de γ Pg à 5 p. 100 en protéines, à l'état natif ou comprimé à 7 000 et 9 000 kg/cm², et qui sont additionnées d'alun d'ammonium à 2 p. 100, à raison de 10 ml pour 20 mg d'azote de protéines. On neutralise par la soude N/10 et l'on injecte aux animaux la suspension convenablement diluée et additionnée de chlorure de sodium. Deux lapins ont été immunisés au moyen de chacun de ces antigènes de la manière suivante :

Quatre injections intraveineuses la première semaine et une injection sous-cutanée, plus trois injections intraveineuses pendant chacune des trois semaines suivantes aux doses ci-après : 0,1 mg d'azote anti-

(1) Toutes les compressions furent réalisées avec les presses hydrauliques de James et Jacques Basset. Nous tenons à les remercier très chaleureusement.

(2) La variation du pH dans cette zone influence moins la dénaturation par la compression [43], ainsi nous pourrions mieux étudier les autres paramètres. De plus, à ce pH, l'opacité des solutions comprimées est moindre, ce fait nous facilite les manipulations ultérieures.

gène par injection la première semaine, 0,2 mg d'azote la deuxième semaine, 0,4 mg la troisième et 0,8 mg d'azote la quatrième semaine.

Saignée à l'oreille une semaine après la dernière injection, afin de contrôler la teneur en anticorps ; saignée à blanc par cathétérisme de la carotide dix jours après la dernière injection ; on conserve les sérums à la glacière après addition de merthiolate à raison de 1/10 000.

Précipitation spécifique en milieu liquide (méthode de Heidelberger et Kendall [47, 48]). — On ajoute à froid, entre 0° et 4° C, des quantités variables et croissantes d'antigène à une quantité constante d'immunsérum et l'on dose, par microkjeldahl, l'azote de précipité spécifique lavé. Pour déterminer si dans un mélange l'antigène ou l'anticorps est en excès, on met, après centrifugation du précipité, une partie du liquide surnageant en présence d'antigène (méthode du disque) et une autre partie en présence de sérum.

Précipitation spécifique en milieu gélifié (méthode de J. Oudin [22, 23, 25]). — L'immunsérum amené à la dilution voulue est mélangé, à une température de 45 à 48° C, à la gélose en surfusion. Le mélange liquide est distribué dans des tubes de 2 mm de diamètre préalablement revêtus à l'intérieur d'une mince couche de gélose sèche, que l'on place dans une chambre à température constante. Après solidification on répartit, au-dessus du mélange gélifié, les solutions aqueuses des antigènes à étudier, amenés à la même température. Les observations et les photographies se feront dans la même chambre. On prépare en même temps des témoins contenant, au lieu du sérum immun, du sérum de lapin non immunisé, qui recevront, dans les mêmes conditions, les mêmes solutions d'antigène.

Après un certain temps, il apparaît dans la couche de gélose une zone opaque qui correspond au précipité spécifique formé. L'opacité de cette zone est progressivement dégradée vers le haut des tubes où il y a l'inhibition par excès d'antigène.

L'opacité des zones spécifiques est fonction de la richesse du gel en anticorps et indépendante de la concentration de la couche liquide en antigène. Cette dernière agit seulement sur la vitesse de progression de la zone et sur son apparition, car pour une concentration donnée du gel en anticorps, au-dessous d'une certaine concentration de l'antigène, aucune zone n'apparaît.

Résultats et discussion.

I. — MODIFICATIONS DES PROPRIÉTÉS ANTIGÉNIQUES

A. — PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE EN MILIEU LIQUIDE.

1° Réactions des immunsérums anti- γ Pg natives (tableau I, fig. 1).

Points d'équivalence. — La quantité d'antigène nécessaire pour neutraliser la même quantité des mêmes anticorps est d'autant plus grande que l'antigène a été soumis à une compression plus forte.

TABLEAU I. — Courbes de précipitation du sérum lapin anti- γ Pg natives avec le même antigène natif ou comprimé à diverses pressions.

ANTIGÈNES	γ Pg natives			γ Pg comprimées à 5.000 Kg/cm ²			γ Pg comprimées à 7.000 Kg/cm ²			γ Pg comprimées à 9.000 Kg/cm ²		
	μ g d'azote d'antigènes ajoutés à 1 ml de sérum	μ g d'azote précipité par ml de sérum	Surnageant (*)	μ g d'azote précipité par ml de sérum	Surnageant	μ g d'azote précipité par ml de sérum	Surnageant	μ g d'azote précipité par ml de sérum	Surnageant	μ g d'azote précipité par ml de sérum	Surnageant	
			S A		S A		S A		S A		S A	
10	106	C +		100	O +	86	O +	62	O +			
10	152	C +		138	O +	110	O +	78	O +			
		P.E.										
10	196	+ O		187	O +	132	O +	106	O +			
					P.E.							
10	150	+ C		105	+ C	216	O +	136	O +			
							P.E.					
100	144	+ O		236	+ O	270	+ O	256	O +			
									P.E.			
200	130	+ O		212	+ O	320	+ C	352	+ O			
500	73	+ O		150	+ O	320	+ O	523	+ O			
1.000	30	+ O		86	+ O	216	+ O	500	+ O			
2.000	10	+ O		54	+ O	102	+ O	236	+ O			

(*) Recherche du point d'équivalence :

S = « ring-test » effectué avec le surnageant et le sérum.

A = « ring-test » effectué avec le surnageant et l'antigène.

Le point (ou la zone) d'équivalence est encadré.

Maximum de la courbe. — a) Le poids maximum d'azote précipité est d'autant plus élevé que l'antigène a été soumis à une pression plus forte.

b) Le maximum de précipité correspond à une quantité d'antigène qui augmente avec le traitement subi par cet antigène. On remarque en outre que le maximum de précipité correspond sensiblement au point d'équivalence pour l'antigène naturel et à une quantité d'antigène franchement plus élevée pour les préparations d'antigène comprimé (le double ou plus).

$R = \frac{\text{Az d'anticorps}}{\text{Az d'antigène}}$: au voisinage du point d'équivalence ce rapport est d'autant plus faible que la compression a été plus forte.

2° Réactions des immunsérums anti- γ Pg comprimés à 7 000 kg/cm² (tableau II, fig. 2).

Bien que l'immunsérum dont on se sert ici ait été préparé par injection aux animaux d'une préparation comprimée et non d'une préparation native, l'aspect général des courbes est très semblable à celui qui vient d'être décrit, et les mêmes remarques pourraient être faites. En particulier, les deux courbes de précipitation de

l'antigène natif avec les deux immunosérums ont des aspects très voisins. Ici encore la quantité d'antigène aux points d'équivalence et le maximum d'azote précipité augmentent, tandis que le rapport

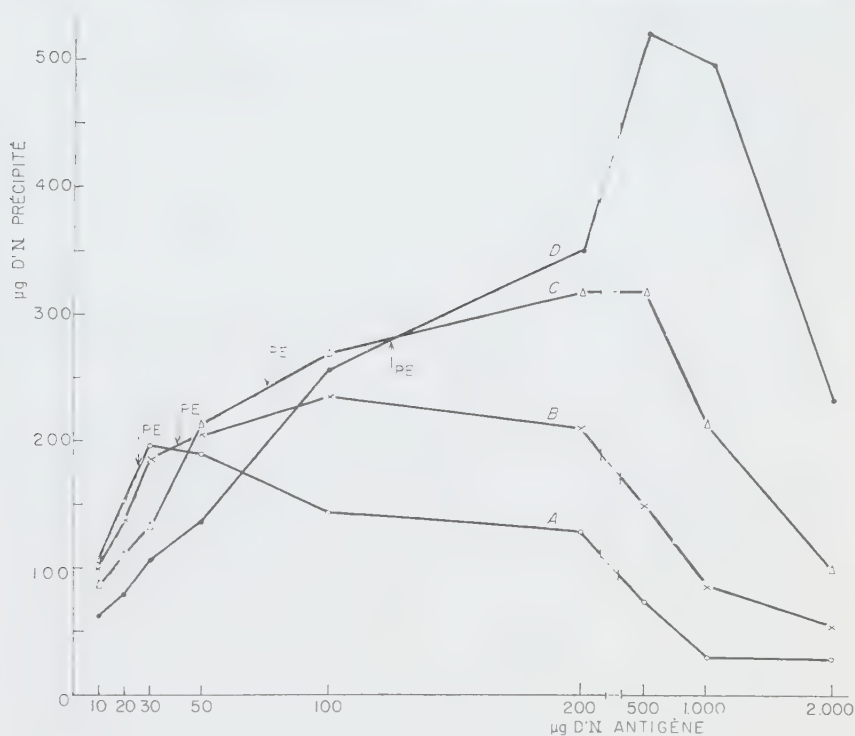


FIG. 1. — Courbes de précipitation du sérum de lapin anti- γ Pg natives avec :

A — γ Pg natives.

B — γ Pg comprimées à 5 000 kg/cm².

C — γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm².

D — γ Pg comprimées à 9 000 kg/cm².

(Les flèches indiquent les zones d'équivalence.)

aux points d'équivalence diminue à mesure que les globulines antigènes ont été plus fortement comprimées.

★★

Les courbes obtenues en faisant réagir les antigènes plus ou moins comprimés avec un immunosérum ont des aspects et des caractères différents selon l'importance de la compression subie par l'antigène. Mais le fait que les différences entre ces courbes

se retrouvent assez semblables à elles-mêmes, quand l'immunsérum qui réagit au lieu d'être anti- γ Pg natives est anti- γ Pg comprimées, indique que ces différences ne sont pas dues ou ne sont pas principalement dues à des changements de spécificité subis par l'antigène lors de la compression.

Les variations du rapport $R = \frac{\text{Az d'anticorps}}{\text{Az d'antigène}}$ à l'équivalence

donnent à penser que les différences observées dans le comportement des différentes préparations sont dues, au moins pour une part importante, à des modifications de poids moléculaires des γ Pg antigènes. On sait en effet que pour des anticorps de même poids moléculaire, ce rapport est d'autant plus faible que le poids moléculaire de l'antigène est plus élevé (Hooker et Boyd [8, 9]).

TABLEAU II. — Courbes de précipitation du sérum de lapin anti- γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm² avec le même antigène natif ou comprimé à 7 000 et 9 000 kg/cm².

ANTIGENES	γ Pg natives			γ Pg comprimées à 7.000 Kg/cm2			γ Pg comprimées à 9.000 Kg/cm2		
μ g d'azote d'antigène ajouté à 1ml de sérum	μ g d'azote précipité par ml de sérum	(*) Surnageant		μ g d'azote précipité par ml de sérum	Surnageant		μ g d'azote précipité par ml de sérum	Surnageant	
		S	A		S	A		S	A
10	118	0	+	90	0	+	86	0	+
20	176	0	+	144	0	+	110	0	+
30	204	0	0	212	0	+	152	0	+
50	214	+	0	236	0	0	180	0	+
								P . E	
100	212	+	0	332	+	0	310	±	0
200	172	+	0	422	+	0	398	-	0

(*) Voir légende du tableau I.

Hooker et Boyd ont discuté sur des bases théoriques et expérimentales l'influence du poids moléculaire de l'antigène sur le rapport de combinaison de l'antigène à l'équivalence avec des anticorps de poids moléculaire constant. Ils ont tiré de ces considérations une équation qui relie le poids moléculaire à la valeur du rapport $\frac{\text{anticorps}}{\text{antigène}}$.

Nous avons essayé de faire, par les moyens décrits dans leur travail, une évaluation plus ou moins approximative des poids moléculaires de nos antigènes modifiés. Pour cela,

nous avons reporté sur les courbes expérimentales les valeurs du rapport $\frac{\text{anticorps}}{\text{antigène}}$ que nous avons trouvées. Nous indiquons pour mémoire les valeurs obtenues : respectivement 130 000, 790 000 et 2 300 000 pour l'antigène natif et comprimé à 7 000 et 9 000 kg/cm², sachant qu'il ne s'agit là que d'approximations extrêmement imprécises. Leur imprécision est encore augmentée par le fait qu'il ne s'agit pas de substances homogènes, mais de mélanges de plusieurs composés de poids moléculaires différents.

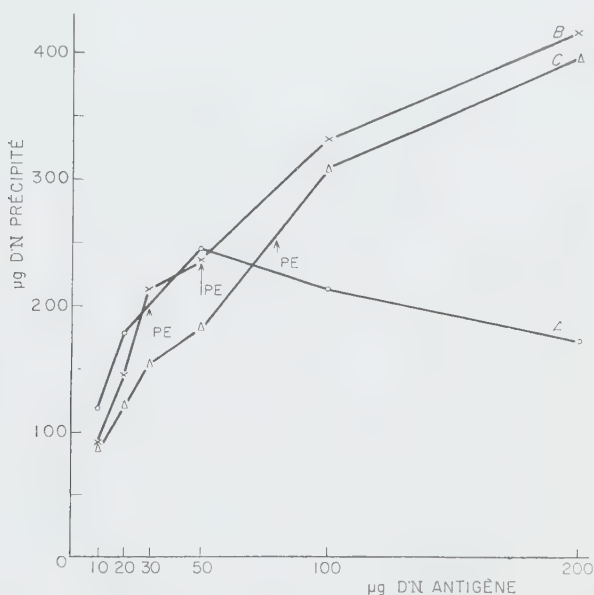


FIG. 2 — Courbes de précipitation du sérum lapin anti- γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm², avec :

A — γ Pg natives.

B — γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm².

C — γ Pg comprimées à 9 000 kg/cm².

(Les flèches indiquent les zones d'équivalence.)

Les autres modifications des courbes des γ Pg comprimées par rapport aux γ Pg natives sont corrélatives de la précédente et peuvent s'expliquer, elles aussi, par le changement du poids moléculaire de l'antigène :

Lorsque le rapport $R = \frac{\text{anticorps}}{\text{antigène}}$ à l'équivalence augmente par le fait de l'augmentation du poids moléculaire de l'antigène, la

même quantité d'anticorps se combine à l'équivalence à une quantité accrue d'antigène. Le poids de précipité total à l'équivalence et au maximum de la courbe est augmenté ; et l'équivalence comme le maximum correspondent, pour un même immunsérum, à un poids plus élevé d'antigène.

B. — PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE EN MILIEU GÉLIFIÉ.

1° Réactions des immunsérums anti- γ Pg natives.

On observe au moins deux zones de précipitation dans la plupart des tubes, particulièrement dans les deux premiers (Pl. fig. 1), ce qui indique que l'immunsérum réagit au moins avec deux antigènes différents contenus dans la préparation. La première zone, qui est aussi la plus dense, est presque sûrement celle du principal constituant de la préparation. La deuxième zone, dont la pénétration et la densité sont toutes deux nettement plus faibles, correspond donc à un constituant nettement moins abondant.

La comparaison des sept derniers tubes indique :

1° Une diminution de la pénétration de la zone principale, particulièrement nette dans les derniers tubes ;

2° Une modification de l'aspect de la zone dont la frontière, nette pour la préparation native, devient progressivement de plus en plus imprécise pour les préparations comprimées. Des observations semblables pourraient être faites pour la dernière zone moins dense, indiquant que les deux constituants qui réagissent ont subi un sort analogue.

Il ne semble pas que la densité de précipité de la zone principale ait subi une diminution considérable, en relation avec la compression de l'antigène.

On sait que, pour la zone d'un antigène donné, la distance de sa frontière à l'interface à un temps donné est d'autant plus grande que la concentration initiale de l'antigène est plus forte ou que la concentration de l'anticorps dans le gel est plus faible [23]. En outre, une diminution du coefficient de diffusion de l'antigène aurait pour conséquence une diminution de la pénétration de sa zone.

Les effets de la compression peuvent consister en :

a) Des modifications de la spécificité de l'antigène ou de son aptitude à se combiner à l'anticorps ;

b) Des modifications des propriétés physiques de l'antigène sans altération qualitative de sa spécificité.

Si la compression avait entraîné une modification de la spécificité, telle par exemple que la destruction élective d'une partie des groupements spécifiques sans changements importants des propriétés physiques de l'antigène, une partie des anticorps de

l'immunsérum anti- γ Pg natives aurait cessé de participer à la combinaison avec l'antigène comprimé. Il aurait résulté de la compression de l'antigène une diminution de la concentration des anticorps capables de réagir avec lui et par conséquent une augmentation de la pénétration de la zone. Or, on observe une diminution de cette pénétration. En outre, on verra plus loin que les résultats des expériences d'épuisement sont incompatibles avec un effet de cette nature.

On peut supposer que la compression a entraîné la perte totale de spécificité ou de réactivité d'une partie seulement des molécules d'antigène. La diminution de concentration de l'antigène qui en serait le résultat entraînerait en effet une diminution de la pénétration de la zone de précipitation.

Cette explication n'est cependant pas nécessaire, comme on va le voir, mais il n'est pas exclu que cet effet se surajoute aux effets suivants.

Une augmentation de poids moléculaire de l'antigène peut intervenir dans la réaction en tubes de gel de deux manières différentes :

a) Comme on l'a vu, elle abaisse le rapport de combinaison $\frac{\text{anticorps}}{\text{antigène}}$ à l'équivalence et l'effet en est analogue à celui d'une diminution, dans les mêmes proportions, de la concentration d'antigène ;

b) La diminution corrélative du coefficient de diffusion a pour effet, elle aussi, de diminuer la pénétration de la zone.

Cette agrégation ou polymérisation de l'antigène a déjà été envisagée pour expliquer des observations faites dans les réactions de précipitation en milieu liquide et surtout on verra qu'elle est démontrée par l'ultracentrifugation [13]. Elle doit donc être considérée comme la cause principale de la diminution de pénétration de la zone de précipitation.

La modification d'aspect de la frontière de la zone de précipitation est plus difficile à expliquer. Des zones d'aspect analogue ont été observées par Oudin [24] avec les polysaccharides comme antigènes précipitants et un rapprochement avait été fait à cette occasion entre l'aspect de la zone et la polydispersion de l'antigène.

2° Réactions des immunsérums anti- γ Pg comprimées.

a) Immunsérum anti- γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm². — On observe une seule zone dans les cinq premiers tubes et deux zones dans les trois derniers (Pl. fig. 2).

Il semble bien, d'après l'aspect des tubes et leur comparaison avec ceux de la figure précédente, que la zone unique des cinq

premiers tubes et la deuxième zone des trois derniers tubes aient la même signification que la zone principale observée au paragraphe précédent avec le sérum anti- γ Pg natives.

On peut vérifier cette conclusion en appliquant le moyen d'identification récemment tiré par Oudin des lois quantitatives de la réaction en tubes de gel [25] : si l'on prend un calque de frontières de la zone unique des cinq premiers tubes et de la deuxième zone des trois derniers tubes de la figure 5, ce calque se superpose aux frontières de la première zone de la figure précédente (Pl. fig. 1).

La zone supplémentaire observée dans les trois derniers tubes révèle l'existence de deux antigènes dans les solutions comprimées à 6 000, 7 000 et 9 000 kg/cm².

Il est généralement admis que, pour que les deux molécules antigéniques puissent donner lieu à deux zones de précipitation, il faut qu'elles diffèrent tant soit peu par leur spécificité et non pas seulement par leurs propriétés physiques ; c'est la conclusion

LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — Réaction de l'immunsérum anti- γ Pg natives avec, dans l'ordre respectif des positions des tubes, de gauche à droite : 1 : Sérum de cheval normal ; 2 : γ Pg natives ; 3 à 8 : γ Pg comprimées à 3 000, 4 000, 5 000, 6 000, 7 000 et 9 000 kg/cm².

FIG. 2. — Réaction de l'immunsérum anti- γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm² avec dans l'ordre respectif des tubes, de gauche à droite : 1 : Sérum de cheval normal ; 2 : γ Pg natives ; 3 à 8 : γ Pg comprimées à 3 000, 4 000, 5 000, 6 000, 7 000 et 9 000 kg/cm².

FIG. 3. — Réaction de l'immunsérum anti- γ Pg comprimées à 9 000 kg/cm² avec dans l'ordre respectif des tubes, de gauche à droite : 1 : Sérum de cheval normal ; 2 : γ Pg natives ; 3 à 8 : γ Pg comprimées à 3 000, 4 000, 5 000, 6 000, 7 000 et 9 000 kg/cm².

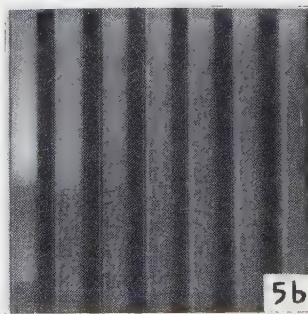
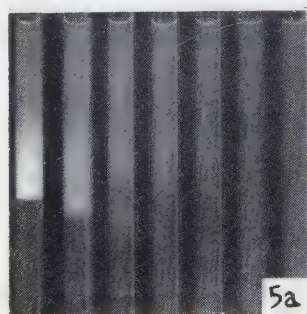
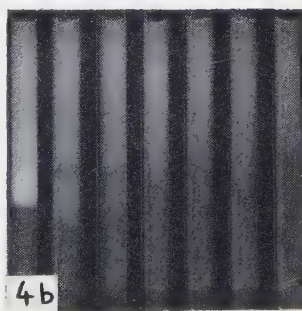
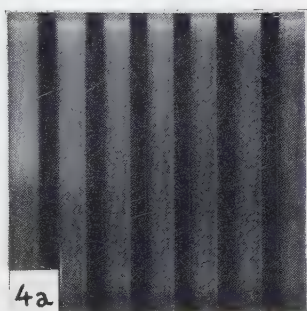
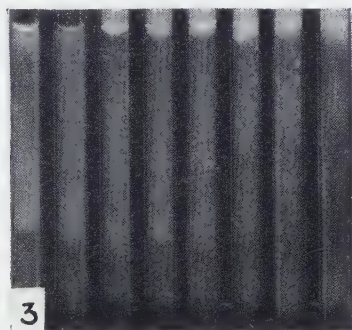
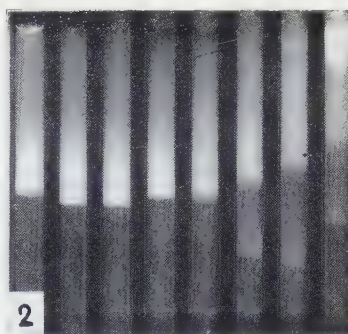
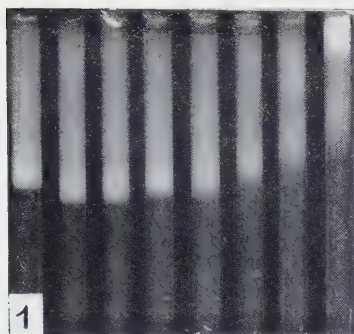
(Une zone de densité très faible présente dans les trois derniers tubes et difficilement visible sur la figure est indiquée par un trait blanc.)

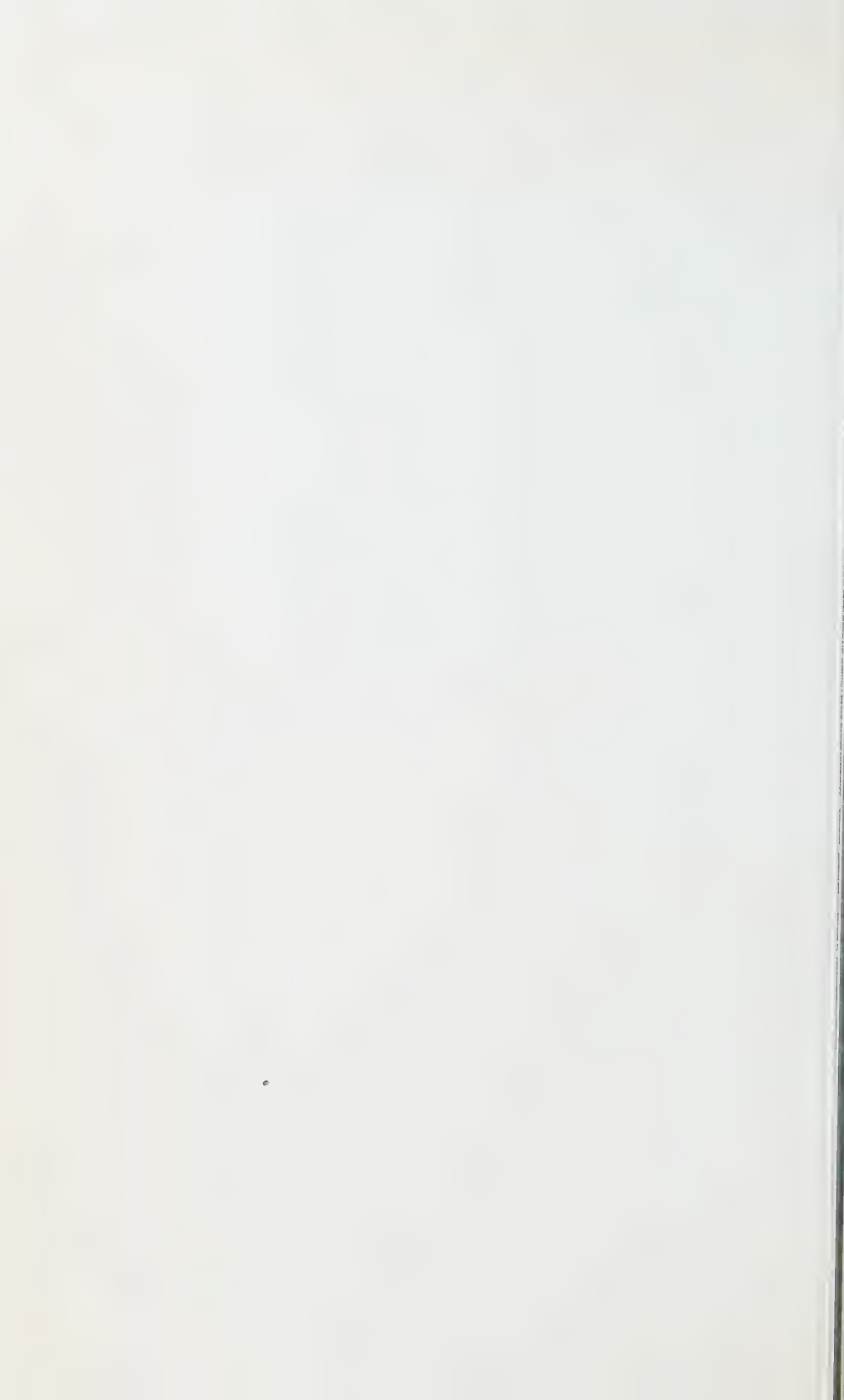
FIG. 4. — Réaction de l'immunsérum anti- γ Pg natives épuisé par γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm² : a) avec γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm² ; b) avec γ Pg natives.

(Les épuisements sont faits en ordre respectif des positions des tubes, de gauche à droite, par 0, 30, 50, 75, 100, 150 et 200 μ g d'azote d'antigène pour 1 ml de sérum.)

FIG. 5. — Réaction de l'immunsérum anti- γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm², épuisé par γ Pg natives : a) avec γ Pg natives ; b) avec γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm².

(Les épuisements sont faits en ordre respectif des positions des tubes, de gauche à droite, par 0, 10, 20, 30, 50, 75 et 100 μ g d'azote d'antigène pour 1 ml de sérum.)





du raisonnement suivant qui concerne un cas particulier de système complexe :

« On peut logiquement admettre que dans les régions de la colonne de gel comprise entre le maximum de densité de la zone de précipitation et l'interface (zone d'inhibition), les anticorps capables de précipiter avec l'antigène du système ne sont plus sous la forme libre ; la combinaison avec l'antigène en excès, dans laquelle ces anticorps sont engagés, rend impossible leur précipitation par le même antigène... » [24].

Nous avons cependant pensé pouvoir faire la réserve suivante : lorsque les anticorps sont engagés sous forme de composés solubles dans une combinaison avec un antigène de faible poids moléculaire, en excès, n'est-il pas possible que l'antigène puisse être déplacé par une molécule de même spécificité antigénique, mais beaucoup plus grosse ou moins soluble, pour donner des composés insolubles ?

Si cette réserve était justifiée, le liquide surnageant d'un mélange contenant l'immunsérum anti- γ Pg natives et un fort excès de l'antigène homologue, quoique ne précipitant pas avec ce même antigène homologue, devrait pouvoir précipiter avec les γ Pg comprimées. Mais l'expérience a montré qu'une telle précipitation ne se produisait pas.

Il semble donc bien établi que deux antigènes de spécificité partiellement ou totalement différentes sont responsables des deux zones de la figure 2. D'autre part, on verra plus bas que l'épuisement de l'immunsérum anti- γ Pg comprimé à 7 000 kg/cm² par les γ Pg natives fait disparaître les deux zones et par conséquent aucun de ces deux antigènes ne possède une spécificité nouvelle par rapport à la préparation native.

On est amené à rapprocher de ceci certaines observations, exposées dans le mémoire suivant [13], faites par l'ultracentrifugation. De même que, dans la réaction en tubes de gel, la préparation native ne donne qu'une seule zone, l'ultracentrifugation n'y décèle qu'un seul constituant. De même que dans les préparations comprimées, la réaction en tubes de gel décèle deux antigènes, l'ultracentrifugation décèle trois constituants, dont l'un a un poids moléculaire plus faible que la protéine native.

On vient de voir que les différences de poids moléculaire ne suffisent pas à expliquer la présence de deux zones et qu'il faut que les deux molécules qui en sont cause aient des spécificités plus ou moins différentes.

On est donc conduit à formuler l'hypothèse que l'un des constituants de la préparation comprimée ne porterait qu'une partie de la spécificité de l'antigène natif (ce serait probablement le constituant de poids moléculaire faible), alors que les autres constituants porteraient la spécificité totale de l'antigène natif. Ce qu'on sait

des systèmes précipitants complexes [24] est en accord avec l'apparition d'une nouvelle zone de précipitation dans ce cas, si la concentration de l'antigène « partiel » est suffisamment élevée par rapport à la concentration de l'antigène « total ».

On remarque cependant que la zone supplémentaire ne s'observe pas dans les réactions avec l'immunsérum anti- γ Pg natif ; il est possible que, pour une raison inconnue, cet immunsérum ne contienne pas d'anticorps contre la partie de la spécificité représentée sur l'antigène « partiel ».

b) *Immunsérum anti- γ Pg comprimées à 9 000 kg/cm².* — La série de tubes qui a été faite avec cet immunsérum (fig. 3) donne lieu à des observations très semblables à celles qui précèdent, à deux différences près :

1° Les zones de précipitation ont une opacité plus faible que dans le cas précédent sans qu'on puisse savoir si la concentration plus faible des anticorps est imputable à une diminution du pouvoir antigénique de l'antigène injecté ou plutôt à la variabilité individuelle des animaux.

2° On observe dans les premiers tubes deux zones de précipitation distinctes, dont la première correspond manifestement à la zone principale du paragraphe précédent ; la concentration plus faible des anticorps entraîne naturellement ici une pénétration plus forte. Comme il a été observé au paragraphe (immunsérum anti- γ Pg natives), les deux zones de précipitation suivent un sort analogue, ce qui semblerait indiquer que l'effet de la compression sur les protéines de la préparation ne varie pas considérablement selon la nature des molécules qui la subissent.

Ici encore une zone supplémentaire s'observe dans les trois derniers tubes, manifestement de même nature que dans la série précédente.

3° *Epuisement des immunsérums et leurs réactions en milieu gélifié.*

a) *Réactions de l'immunsérum anti- γ Pg native épuisé par les γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm².* — On a fait des mélanges à volume constant d'une quantité constante d'immunsérum avec des quantités croissantes d'antigène γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm², choisies de telle sorte que les doses de γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm², pour 1 ml d'immunsérum, soient 30, 50, 75, 100 et 200 μ g d'azote d'antigène, sachant que le point d'équivalence déterminé avec l'établissement des courbes de type Heidelberger correspondait à une dose comprise entre 50 et 100 μ g d'azote d'antigène. Les surnageants de ces mélanges centrifugés ont été incorporés aux gels dans lesquels la concentration finale de sérum était de 68 p. 100. On les a fait réagir dans les tubes avec les

solutions de γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm² et γ Pg natives à la concentration de 5 p. 100.

Dans ces deux séries de tubes, la zone unique de γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm² et la zone principale des γ Pg natives sont très atténuées par la dose de 30 μ g et tout à fait effacées par la dose de 75 μ g d'azote (fig. 4).

Les γ Pg natives donnent une deuxième zone de pénétration plus faible, qui semble effacée par 100 μ g, et une troisième de pénétration encore plus faible qui n'est pas effacée par 200 μ g parce que cette dose est encore insuffisante. A cette dernière réserve près, les γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm² suppriment donc toutes les réactions des γ Pg natives avec immunsérum homologue et ceci permet de conclure que les γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm² ont conservé toute la spécificité des γ Pg natives.

b) *Réactions de l'immunsérum anti- γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm² épuisé par les γ Pg natives.* — Cette réaction a été conduite d'une manière analogue à celle du paragraphe précédent, mais ici l'immunsérum anti- γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm² a été épuisé par γ Pg natives aux doses de 10, 20, 30, 50, 75 et 100 μ g d'azote d'antigène pour 1 ml de sérum et l'on a fait réagir en tubes de gel le liquide surnageant de ces épuisements avec les γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm² (pl. fig. 5).

Deux zones distinctes et assez éloignées se voient dans la réaction homologue (celle de l'immunsérum avec les γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm²) et l'épuisement par 30 ou 50 μ g d'azote d'antigène les fait disparaître toutes les deux. De même dans les réactions hétérologues (celle de l'immunsérum avec les γ Pg natives), ces doses ne laissent persister qu'une zone de pénétration et de densité très faible, à peine visible sur les photographies. Donc les γ Pg natives suppriment pratiquement les réactions de l'immunsérum anti- γ Pg comprimées à 7 000 kg/cm² avec l'antigène homologue ; d'où l'on conclut que la compression à 7 000 kg/cm² n'a fait apparaître sur les γ Pg aucune spécificité qui ne s'y trouvait déjà à l'état natif.

II. — MODIFICATIONS DE LA FONCTION ANTICORPS

Nous étudions à présent l'action des hautes pressions sur des γ Pg préparées à partir du sérum de cheval hyperimmunisé contre la toxine diphtérique ou tétanique. Dans les deux systèmes précipitants, qu'il s'agisse de la réaction des γ Pg du sérum de cheval normal avec anti-sérum de lapin, ou de la réaction des γ Pg du sérum de cheval immunisé avec la toxine diphtérique, la protéine traitée par les hautes pressions est toujours de même nature chimique, dans un cas elle est utilisée comme antigène, dans l'autre comme anticorps ; cette analogie de la constitution

chimique nous permettra de comparer la sensibilité de la fonction antigène et de la fonction anticorps à l'égard de la pression.

En ce qui concerne les propriétés antigéniques de ces protéines, nous n'avions pas remarqué, au moins qualitativement, une modification de spécificité. Mais, nous allons voir à présent que lorsque ces protéines proviennent d'un sérum antitoxique, leur fonction anticorps est beaucoup plus sensible à l'action de la pression que leur spécificité antigénique.

Nous avons étudié les modifications de deux propriétés des protéines anticorps : leur pouvoir floculant et leur pouvoir neutralisant.

A. — **POUVOIR FLOCLANT.** — Nous avons déterminé le pouvoir floculant des γ Pg antitoxiques, avant et après la compression, en utilisant la technique de Ramon, c'est-à-dire en mélangeant une quantité constante de toxine à des quantités croissantes de la solution protéique à étudier. Le tableau III rassemble les résultats de la floculation des solutions de γ Pg antidiphthériques, à la concentration de 2,5 p. 100 en protéine, soumises à différentes pressions.

TABLEAU III.

TUBES	1	2	3	4	5	6	Temps de Primo-floculation en minutes
Toxine (ml)	1	1	1	1	1	1	
Antitoxine (ml)	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	
Eau physiologique	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	
Antitoxine non comprimée	L	f	f	F	f	f	22 mn
Antitoxine comprimée à 2.000 kg/cm ²	L	f	f	F	f	f	25 mn
comprimée à 3.000 kg/cm ²	L	f	f	F	f	f	55 mn
comprimée à 4.000 kg/cm ²	O	L	f	F	f	f	3 h 1/2
comprimée à 5.000 kg/cm ²	O	L	L	L	L	L	-
comprimée à 6.000 kg/cm ²	O	O	l	l	l	l	-
comprimée à 7.000 kg/cm ²	O	O	O	O	O	O	

F = primo-floculation.

f = floculation.

O = absence de trouble.

L = louche.

l = faible louche.

Nous voyons que la vitesse de floculation des antitoxines comprimées diminue nettement en fonction des pressions jusqu'à 4 000 kg/cm². Il faut noter cependant qu'il n'y a aucun déplacement de l'optimum, c'est-à-dire que la primofloculation est observée toujours dans le même tube.

A partir de 5 000 kg/cm², les mélanges antitoxine comprimée-toxine ne sont plus floculés dans aucun tube, nous observons tout de même un louche dans les tubes de mélanges de l'antitoxine comprimée à 5 000 kg/cm², alors que les mélanges faits avec l'antitoxine comprimée à 7 000 kg/cm² restent tout à fait clairs.

Nous nous sommes ainsi demandé si dans les mélanges non floculables la toxine était combinée avec l'antitoxine comprimée ou, au contraire, si elle était restée libre. Si la toxine était restée libre dans les mélanges non floculables, une nouvelle addition de l'antitoxine native aurait pu provoquer la floculation, mais nous avons constaté que la toxine n'est plus floculable si elle est préalablement mise en contact avec l'antitoxine comprimée à 5 000 kg/cm². Ce résultat prouve que l'antitoxine comprimée a conservé encore les propriétés de se combiner avec la toxine, ce qui sera confirmé par les expériences portant sur la neutralisation. Ainsi, les antitoxines comprimées, non seulement ne floculent pas avec la toxine, mais exercent une action inhibitrice spécifique sur la réaction de floculation de l'antitoxine native avec la toxine. L'antitoxine diphtérique, même comprimée à 7 000 kg/cm² ou plus et ayant par conséquent perdu ses pouvoirs floculants, précipitants et neutralisants, ajoutée à l'antitoxine native à raison de 20 p. 100 de celle-ci, inhibe partiellement la floculation. Ajoutée à raison de 50 p. 100 de la quantité d'antitoxine native elle inhibe complètement la floculation et diminue l'opacification du mélange sans l'empêcher complètement.

Nous avons étudié avec des résultats analogues plusieurs autres systèmes (antitoxine diphtérique-anatoxine, antitoxine tétanique-toxine, antitoxine tétanique-anatoxine).

B. POUVOIR NEUTRALISANT. — Nous avons comparé l'effet toxique sur les animaux des mélanges de toxine neutralisés par l'antitoxine native et les mélanges de toxine neutralisés par l'antitoxine comprimée.

Nous avons injecté à des groupes de cobayes de même poids (250 g), 0,7 ml des mélanges correspondant à la primofloculation de chaque système représenté sur le tableau III. A des cobayes témoins nous avons injecté 0,7 ml d'un mélange de 1 ml de toxine et 1 ml d'eau physiologique ; ces animaux sont morts au bout de quinze heures ; des hémorragies des capsules surrénales ont été observées à l'autopsie.

Les animaux qui avaient reçu le mélange toxine-antitoxine native n'ont présenté aucun trouble sensible. Les animaux qui avaient reçu les mélanges contenant de l'antitoxine comprimée jusqu'à 5 000 kg ont survécu sans présenter de troubles apparents. Les animaux auxquels nous avons injecté le mélange contenant de l'antitoxine comprimée à 6 000 kg/cm² sont morts entre les cinquante-cinquième et soixante-cinquième heures. Ceux qui avaient reçu le mélange contenant de l'antitoxine comprimée à 7 000 kg/cm² sont morts entre les vingt-deuxième et vingt-cinquième heures et enfin ceux qui avaient reçu le mélange contenant de l'antitoxine comprimée à 9 000 kg/cm² sont morts vingt heures après l'injection.

Nous avons procédé de la même façon pour déterminer la toxicité des mélanges correspondant à la primofloculation du système antitoxine tétanique-toxine et les résultats obtenus étaient comparables à ceux que nous venons de citer. Donc, contrairement à ce que nous venons de voir pour le pouvoir floculant, les pressions inférieures à 5 000 kg/cm² épargnent totalement les propriétés neutralisantes de l'anticorps antitoxique. Les pressions de l'ordre de 6 000 kg/cm² en détruisent seulement une partie et enfin cette propriété est détruite dans sa quasi-totalité par les pressions de l'ordre de 9 000 kg/cm². Il n'y a donc pas de parallélisme de comportement des propriétés floculantes et neutralisantes à l'égard de la compression, bien que la disparition (à 7 000 kg) de toute opacification visible corresponde à une perte presque totale du pouvoir neutralisant.

RÉSUMÉ.

1° Les résultats des réactions de précipitation spécifique faites dans les milieux liquides indiquent une augmentation du poids moléculaire moyen de l'antigène consécutive à la compression.

2° Les réactions de précipitation spécifique en milieu gélifié montrent :

a) Une diminution de la pénétration des zones de précipitation des antigènes comprimés, explicable par l'abaissement du rapport $\frac{\text{anticorps}}{\text{antigène}}$ et du coefficient de diffusion, conséquence de l'augmentation de poids moléculaire.

b) Un aspect de plus en plus imprécis de la frontière des zones principales de précipitation à mesure que la pression est plus importante.

Lorsqu'on observe plusieurs zones, leur comportement est semblable, indiquant que les différents constituants antigéniques de la préparation subissent un sort analogue.

Les réactions d'épuisement ont montré que la spécificité globale

des Pg n'est pas modifiée par la compression : les préparations les plus comprimées ont conservé au moins qualitativement la spécificité des Pg natives. Ces épuisements n'ont pas mis en évidence une nouvelle spécificité, malgré l'apparition d'une nouvelle zone de précipitation.

3° D'une manière générale, la compression jusqu'à 3 000 kg/cm² apporte un retard à la floculation des solutions de Pg antitoxiques, sans que l'optimum de floculation soit déplacé. Les pressions de l'ordre de 4 000 à 5 000 kg/cm² provoquent la disparition complète de la floculation.

Contrairement au pouvoir floculant, les pressions inférieures à 5 000 kg/cm² épargnent totalement les propriétés neutralisantes de l'anticorps antitoxique. Les pressions de l'ordre de 6 000 kg/cm² en détruisent seulement une partie ; l'antitoxine comprimée à cette pression n'est plus capable de neutraliser exactement la toxine correspondante. Enfin, cette propriété est détruite dans sa quasi-totalité par des pressions de l'ordre de 9 000 kg/cm². Il n'y a donc pas de parallélisme de comportement des propriétés floculantes et neutralisantes à l'égard de la compression.

Les γ Pg antitoxiques comprimées, non seulement ne précipitent pas avec la toxine, mais exercent une action inhibitrice spécifique sur les réactions de floculation de l'antitoxine native et la toxine.

SUMMARY

ALTERATIONS OF ANTIGEN AND ANTIBODY PROPERTIES OF HORSE SERUM γ PSEUDOGLOBULINS RESULTING FROM HIGH HYDROSTATIC PRESSURES.

γ -pseudoglobulins (γ Pg) of horse serum were submitted to high hydrostatic pressure whereafter their antigenic and antibody properties were determined.

1° Quantitative immunochemical analysis, by precipitation in liquid phase of treated proteins, reveals an increase of the molecular weight of the antigen.

2° Immunochemical analysis in agar gel, shows a decrease of the diffusion coefficient of the treated antigen and of the ratio $\frac{\text{antibody}}{\text{antigen}}$. Their decrease is correlated to an increase in the molecular weight together with a widening of the zone of precipitation. It was not possible to detect the presence of an antigen endowed with new specificity in the treated proteins.

3° High pressure modifies the behaviour of γ Pg antibodies : at 3 000 kg/cm², there is a delay in flocculation of treated antibodies with their homologous antigen, although there appears to

be no change in the proportions of constituents at optimum flocculation. After treatment at 5 000 kg/cm², the flocculating activity is destroyed. On the other hand, antitoxic properties remain unchanged up to treatments at 5 000 kg/cm². Beyond this point neutralizing power decreases rapidly, once disappears almost completely in antitoxic γ Pg treated at 9 000 kg/cm².

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARBU (E.), BASSET (J.) et JOLY (M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1954, **36**, 323.
- [2] BARBU (E.). *Thèse de doctorat (Sciences)*, 1952, Paris.
- [3] BASSET (J.). *Chim. Industrie*, 1945, **53**, 303.
- [4] BASSET (J.) et MACHEBOEUF (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1937, **58**, 58.
- [5] BASSET (J.) et MACHEBOEUF (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1933, **196**, 67.
- [6] BORDET (P.) et CHOME (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 532.
- [7] BOYD (W. C.). *J. exp. Med.*, 1946, **83**, 401.
- [8] BOYD (W. C.) et HOOKER (S. B.). *J. gen. Physiol.*, 1939, **22**, 281.
- [9] BOYD (W. C.) et HOOKER (S. B.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1938, **39**, 491.
- [10] BRIDGMAN (P. W.). *J. biol. Chem.*, 1914, **19**, 511.
- [11] BRIDGMAN (P. W.) et CONANT. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1929, **15**, 680.
- [12] CAMPBELL (O. H.) et JOHNSON (F. H.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, **68**, 725.
- [13] CHAHBASI (P.). *Ann. Inst. Pasteur* (sous presse).
- [14] CURL (L.) et JANSEN (E.). *J. biol. Chem.*, 1950, **184**, 45 et **185**, 713.
- [15] DUBERT (J.-M.), SLIZEWICZ (P.), BASSET (J.) et MACHEBOEUF (M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1952, **34**, 418.
- [16] EYRING (H.), JOHNSON (F. H.) et GENSLE (R. L.). *J. Phys. Chem.*, 1946, **50**, 453.
- [17] HEIDELBERGER (M.). *Chem. Rev.*, 1939, **24**, 323.
- [18] HEIDELBERGER (M.) et KENDALL (F. E.). *J. exp. Med.*, 1932, **55**, 555.
- [19] MACHEBOEUF (M.) et BASSET (J.). *Ergeb. Enzymforsch.*, 1934, **111**, 303.
- [20] MACHEBOEUF (M.) et BASSET (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1932, **195**, 1431.
- [21] MACHEBOEUF (M.), BASSET (J.) et PÉREZ (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1935, **200**, 496.
- [22] OUDIN (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **222**, 115.
- [23] OUDIN (J.). *Methods in medical Research*, Year Book, Pub., Chicago, vol. V, 1952, 335-375.
- [24] OUDIN (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **75**, 30 et 109.
- [25] OUDIN (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 541.
- [26] TALWAR (G. P.), BARBU (E.), BASSET (J.) et MACHEBOEUF (M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1951, **33**, 1793.

DE LA POSSIBILITE DE TRANSFORMER LES VARIÉTÉS DE LA BRUCELLE

par JOSEPH PARNAS (*).

(Chaire de Microbiologie
de l'Académie de Médecine de Lublin)

Les expériences rapportées ici concernent les essais de transformation des variétés de *Brucella* par la méthode de « l'hybridation » métabolique. Nous avons commencé ces expériences en 1945 (Rydzak et Parnas). Elles consistaient alors à cultiver une souche de brucelle de la variété *bovis*, au cours de nombreux repiquages sur un substrat contenant les métabolites de *Proteus* OX 19, et inversement. Ces expériences aboutirent à l'obtention d'une souche de brucelle qui était agglutinable par le sérum anti-*Proteus* OX 19 et, inversement, d'une souche de *Proteus* qui était agglutinable par le sérum anti-brucelle. Ainsi modifiée, antigéniquement et sérologiquement, la nouvelle souche de brucelle se rapprochait beaucoup de l'espèce différente qu'est le *Proteus*, et inversement. L'application de la réaction croisée de saturation d'après Castellani confirma ce phénomène. La transformation des souches concernait aussi leurs particularités allergènes ; la souche de *Proteus* OX 19 modifiée fut mise à profit pour la production d'un allergène qui provoquait une réaction cutanée de Burnet positive.

MATÉRIEL ET MÉTHODE.

On utilisa trois souches de *Brucella*, notamment :

La souche n° 106 variété *melitensis* typique.

La souche n° 81 variété *suis* typique.

La souche n° 24 variété *bovis* typique.

Les caractéristiques de ces souches sont représentées dans le tableau I.

A. OBTENTION DES SUBSTRATS. — Chacune des trois souches fut cultivée sur le milieu de Huddleson dans des boîtes de Roux pendant trois jours. Avant l'ensemencement, on contrôlait la pureté (forme S) par la méthode de Henry et les méthodes de Braun

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 octobre 1956.

TABLEAU I.

N° de la souche	Activité uréasique		Formation de H ² S					Activité bactériostatique de la fuchsine alcaline	Activité bactériostatique de la thionine	Analyse des récepteurs à l'aide de sérums monospécifiques	
	Méthode de Heller	Rouge de phénol	I J.	II J.	III J.	IV J.	V J.			Anti-bovis	Anti-melitens.
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
100		65 ¹	0	0	0	0	0	+++	+++	0	+++
61		5 ¹	+++	+++	+++	++	+	0	++	+++	0
24		25 ¹	+++	+	0	0	0	+++	0	+++	0

et de Burnet, l'addition de forme R ou de forme intermédiaire I entraînant immédiatement le changement des particularités biochimiques ou sérologiques de la souche. Après trois jours de culture à la température de 37° C on préparait une suspension contenant à peu près 20 milliards de bacilles au millilitre d'après l'échelle de Brown. La suspension des *Brucella* était lavée trois à quatre fois et centrifugée pour éliminer toute trace de milieu de culture. Ensuite, les microbes en suspension étaient détruits dans un appareil à ultrasons de 2,800 Kc/sec. pendant à peu près quatre-vingt dix minutes, à une température ne dépassant pas 30° C. Après destruction des brucelles et chauffage à 60° C pendant trente minutes, le substrat contenant les métabolites était prêt. Chaque substrat était dilué jusqu'à contenir à peu près 1 milliard et demi de bactéries et on déterminait sa composition chimique (Mierzejewski).

Epreuve de Piotrovski	++
Epreuve de Heller	—
Epreuve de la xanthoprotéine	++
Epreuve de Molisch	++
Epreuve de Fehling	—

Puis on mesurait la quantité de N dans 1 ml. Elle s'élevait à 0,0007 g/ml.

Pour déterminer le pouvoir antigène des substrats, on les employait à la dilution de 1,5 mlrd/ml, comme antigènes dans la réaction de fixation du complément.

Les résultats de ces épreuves biochimiques indiquent une grande concentration en métabolites et facteurs antigènes dans les substrats.

B. CULTURES CROISÉES DES VARIÉTÉS DE LA BRUCELLE SUR LES MÉTABOLITES HÉTÉROLOGUES. — Les substrats étaient versés dans

des tubes à essai sous le volume de 1 ml. Dans les milieux ainsi préparés on ensemait les suspensions de brucelles dans l'ordre suivant :

I. — Souche PD sur substrat de la variété *bovis* n° 24, 25 passages.

II. — Variété *suis* n° 81, sur le substrat de la variété *melitensis* n° 106, 25 passages.

III. — Variété *suis* n° 81, sur le substrat de la variété *melitensis* n° 106, 25 passages.

IV. — Variété *suis* n° 81, sur le substrat de la variété *bovis* n° 24, 15 passages.

V. — Variété *bovis* n° 24, sur le substrat de la variété *suis* n° 81, 25 passages.

VI. — Variété *suis* n° 81, sur le substrat de la variété *melitensis* n° 106, 14 passages.

VII. — Variété *bovis* n° 24, sur le substrat de la variété *suis* n° 81, 14 passages.

VIII. — Variété *suis* n° 81, sur le substrat de la souche S 19, 25 passages.

IX. — Variété *melitensis* n° 106, sur le substrat de la variété *suis* n° 81, 25 passages.

X. — Variété *melitensis* n° 106, sur le substrat de la variété *suis* n° 81, 10 passages.

La variété PD est une souche bovine avirulente de notre laboratoire.

TABLEAU II.

N° de la souche	T r a n s f e r		E ² S					Actions bactériostatiques		Variété de la souche obtenue
	2 th . de Rose	Rouge de phénol	I	II	III	IV	V	fuosine alcooline	thionine	
I	4'+++	2'+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+++	Atypique bovis
II	3'+++	2'+	+++	+++	+++	+++	+++	0	+++	Atypique suis
III	25'+++	25'+	0	0	0	0	0	+++	+++	Atypique suis
IV	25'+	29'+	0	0	0	0	0	+++	0	Atypique suis
V	3'++	2'+	+++	+++	+++	+++	+++	0	+++	Atypique suis
VI	3'+++	2'++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+++	Atypique suis
VII	3'+++	2'++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+++	Atypique suis
VIII	3'+++	2'++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+++	Atypique suis
IX	3'++	2'++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+++	Atypique suis
X	25'++	29'++	0	0	0	0	0	+++	0	Atypique suis

Chaque ensemencement était maintenu pendant trois ou quatre jours dans une étuve à 18° C ; ensuite on le transférait sur milieu gélose-glucose-sérum de cheval en boîtes de Petri. On contrôlait la pureté des souches (forme S).

Après 14 à 25 passages on effectuait les épreuves en vue de déterminer les variétés d'après la méthode appliquée par nous (Chodkowski, Parnas, 1955). Les résultats de ces épreuves sont présentés sur le tableau II.

Sur ce tableau on voit que les souches originelles des variétés *bovis*, *suis* et *melitensis*, passées sur des substrats contenant des métabolites hétérologues, subissent des transformations caractérisées touchant à l'activité de l'uréase, à la formation de H₂S, à la sensibilité à l'égard des colorants. On observe ici un fait très intéressant, la prédominance des caractères de la variété *suis* sur ceux des variétés *bovis* et *melitensis*.

Nous avons fait l'étude des récepteurs, en utilisant des sérums monospécifiques. Les souches des variétés *melitensis* n° 106, *bovis* n° 24 et *suis* n° 81 soumises à l'agglutination par les sérums monospécifiques anti-*bovis* et anti-*melitensis* donnèrent les résultats suivants :

N° 106	{	Sérum anti- <i>melitensis</i> positif au 1/400.
	{	Sérum anti- <i>bovis</i> positif au 1/50.
N° 24	{	Sérum anti- <i>melitensis</i> positif au 1/50.
	{	Sérum anti- <i>bovis</i> positif au 1/400.
N° 81	{	Sérum anti- <i>melitensis</i> positif au 1/50.
	{	Sérum anti- <i>bovis</i> positif au 1/400.

TABLEAU III.

Souche	Mise en présence de :	Agglutinée au :	Variété obtenue	Contrôle de l'antigène
N° I	Sérum antimelitensis Sérum antibovis	+ 1/50 ++ 1/400	Variété bovis	-
N° II	Sérum antimelitensis Sérum antibovis	++ 1/400 ++ 1/400	Variété interm. bireceptive	-
N° III	Sérum antimelitensis Sérum antibovis	++ 1/400 ++ 1/400	"	-
N° IV	Sérum antimelitensis Sérum antibovis	++ 1/400 ++ 1/400	"	-
N° V	Sérum antimelitensis Sérum antibovis	++ 1/400 ++ 1/400	"	-
N° VI	Sérum antimelitensis Sérum antibovis	++ 1/400 ++ 1/400	"	-
N° VII	Sérum antimelitensis Sérum antibovis	++ 1/400 ++ 1/400	"	-
N° VIII	Sérum antimelitensis Sérum antibovis	++ 1/400 ++ 1/400	"	-
N° IX	Sérum antimelitensis Sérum antibovis	++ 1/400 ++ 1/400	"	-
N° X	Sérum antimelitensis Sérum antibovis	++ 1/400 ++ 1/400	"	-

Les transformations antigéniques subies par les souches numérotées de I à IX sont portées au tableau III.

On voit que, sous l'influence des métabolites contenus dans les substrats, les souches II à X ont acquis des récepteurs qui déterminent leur agglutination par les sérums monospécifiques anti-*melitensis* et anti-*bovis*. L'épreuve a été répétée avec toutes les souches chauffées à 100° pendant soixante-six minutes.

CONCLUSIONS.

Grâce à la méthode de l'« hybridation » métabolique nous avons réussi à transformer les propriétés biochimiques et sérologiques des variétés *melitensis*, *bovis* et *suis* de la brucelle. On obtient par ce procédé des variétés atypiques, intermédiaires, qui se rapprochent par leurs qualités soit de l'une, soit de l'autre des variétés types.

Dans les variétés ainsi obtenues, ce sont les caractères du type *suis* qui dominant. L'étude des récepteurs par l'emploi des sérums monospécifiques montre qu'é, sérologiquement, ces variétés sont bivalentes.

On peut supposer que les phénomènes rapportés ici se produisent également dans la nature. Ils indiquent que les variétés de *Brucella* ne sont pas stables, mais au contraire, sujettes à des variations diverses, caractéristiques du genre.

SUMMARY

POSSIBILITIES OF TRANSFORMATION OF *Brucella* TYPES.

By means of the « metabolic hybridation » method, the authors have succeeded in transforming biochemical and serological properties of *Brucella* var. *melitensis*, *bovis* and *suis*. Atypical, intermediate types are obtained, which possess characters related to one or the other types.

Among the variants obtained, the characters of *suis* type are always dominant. The study of the receptors by means of monospecific sera demonstrate that these variants are serologically bivalent.

BIBLIOGRAPHIE

- PARNAS (J.) et TUSKIEWICZ. *Brucelloza*, Varsovie, 1955, P. Z. W. L.
 ZDRODOWSKI (P. E.). *Brucelloza*, Moscou, 1948 et 1953.
 JUSKOWIEC (M. K.). *Brucelloza*, Moscou, 1954.
 CHODKOWSKI (A.), PARNAS (J.) et HRYNIEWICZ (H.). *Annales U. M. C. S., S. DD*, 1955.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 6 Décembre 1956

Présidence de M. PRÉVOT.

COMMUNICATIONS

INCIDENCE DE LA QUANTITÉ DE VIRUS INOCULÉE SUR L'ÉVOLUTION DE LA MYXOMATOSE EXPÉRIMENTALE

par H. JACOTOT, A. VALLÉE et B. VIRAT.

(*Institut Pasteur, Service de Microbiologie Animale*)

La maladie consécutive à l'inoculation du virus classique de Sanarelli, du virus pleinement pathogène, est si brève chez le lapin d'Europe et si régulièrement fatale, qu'on est assez enclin à la considérer comme peu influencée par la dose de virus.

L'étude du virus « Loiret 55 » nous a montré que lorsqu'on met en œuvre un mutant atténué du virus du myxome, la durée de la période d'incubation est en raison inverse du nombre d'unités virulentes [1].

Pour contrôler et préciser cette notion, nous avons réuni la documentation sur les essais de titrage que nous avons effectués au cours des dernières années. De ces essais, nous avons retenu seulement ceux qui, concernant des suspensions de titre élevé, avaient permis l'établissement d'échelles de virulence assez amples. Cela nous a conduits à négliger les suspensions d'un titre inférieur à 10^5 , et la plupart de celles que nous avons retenues titraient 10^6 . Nous n'avons obtenu qu'assez rarement le titre 10^7 .

Toutes les inoculations ont été pratiquées sur des lapins domestiques, à la dose de 1 ml sous la peau du front.

Dans ces conditions, la première manifestation décelable est l'inflammation de la peau et du tissu sous-jacent, au lieu d'inoculation ; deux ou trois jours après, les localisations palpébrales, auriculaires, anogénitales, commencent à se constituer ; il arrive, mais ce n'est pas constant, qu'après inoculation des dilutions élevées, ces localisations

débutent avec un retard de un ou deux jours. Les phénomènes se déroulent à peu près de la même façon après l'inoculation du virus classique qu'après l'inoculation d'une souche atténuée, mais, dans ce dernier cas, des formations nodulaires caractéristiques s'ajoutent aux localisations inflammatoires ou se substituent à elles d'emblée.

On peut admettre, en matière de myxomatose, que, dans une série de lapins recevant les doses successives d'une échelle de dilution, ceux qui contractent la maladie avec la dilution la plus forte n'ont reçu qu'une unité virulente ou un nombre d'unités virulentes peu supérieur à l'unité (dose minimale infectante).

Nos résultats ont été condensés dans les deux tableaux ci-joints ; on y a porté, pour chaque essai et pour chaque dilution, les durées en jours, de la période d'incubation, de la phase d'évolution clinique, de l'ensemble du processus. C'est dans le premier groupe de trois colonnes, sous l'accolade 1, qu'ont été rangés les lapins ayant reçu la dose minimale infectante, et, comme les échelles de dilution étaient toutes de raison 10, les groupes de colonnes suivants, vers la droite, concernent les lapins ayant reçu respectivement 10, 100, 1 000 et 10 000 doses minimales infectantes (d. m. i.).

Il est indiscutable que, les unités virulentes n'ayant pas été dénombrées à proprement parler, ces chiffres sont approximatifs, mais cela n'affecte pas la rigueur de la progression ; et si, d'un essai à l'autre, la correspondance des dilutions n'est pas mathématiquement exacte, cela n'entache pas d'erreur grave l'allure générale des variations observées.

VIRUS PLEINEMENT PATHOGÈNE (tableau I). — Les souches employées dans ces essais provenaient de divers points du territoire français :

TABLEAU I. — Virus classique pleinement pathogène.

Réf.	1 d.m.i.			10 d.m.i.			100 d.m.i.			1.000 d.m.i.			10.000 d.m.i.		
	Inc.	Evol.	Tot.	Inc.	Evol.	Tot.	Inc.	Evol.	Tot.	Inc.	Evol.	Tot.	Inc.	Evol.	Tot.
1	5	8	13	5	10	15	3	10	13	3	10	13			
4	5	8	13	4	8	12	3	9	12						
6	6	8	14	6	6	12	4	6	10						
7	10	6	16	4	8	12	3	7	10	3	8	11			
10	5	8	13	4	9	13	4	8	12						
11	8	9	17	8	8	16	5	6	11						
12	5	8	13	5	8	13	5	9	14	5 5	8 7	13 12			
13	10	4	14	7	6	13	5	7	12	7	4	11	3 3	9 10	12 13
14	6	10	16	3	12	15				3 3	7 9	10 12			
17	6 4	7 8	13 12	5 4	8 9	13 13	3 3	9 6	12 9	3 2	6 7	9 9	2 2	7 8	9 10
Moyennes	6,36	7,63	14	5	8,36	13,66	3,8	7,7	11,5	3,77	7,33	11,1	2,5	8,5	11

Seine-et-Oise, Eure-et-Loir, Loiret, Sarthe, Dordogne ; le matériel virulent a été prélevé directement sur le lapin domestique (1, 6, 11, 13, 17) ou le lapin de garenne (4), ou passé par moustique (14), par le testicule du lièvre (10) ou sur membrane chorio-allantoïdienne (7).

Les 46 lapins figurant sur le tableau ont contracté une myxomatose mortelle, 34 avec une symptomatologie complète et 12 dans une forme subclassique, mais bien caractérisée.

De l'examen de ce tableau, il se dégage nettement :

1° Que la durée de la période d'incubation est en relation directe avec le taux de dilution du virus ;

2° Que ce taux de dilution est sans influence sur l'évolution ultérieure des manifestations pathologiques.

En somme, la sensibilité du réactif, le lapin, étant pratiquement parfaite vis-à-vis du virus classique, seul le nombre d'unités virulentes intervient comme facteur susceptible de modifier l'évolution ; mais il n'agit que sur la phase de latence qui précède l'apparition des troubles ; le seuil franchi, la maladie évolue dans des délais à peu près constants et indépendants de la dose initiale. La durée totale du processus n'étant fonction que de la dose varie, comme la période d'incubation, en raison inverse de cette dose.

VIRUS ATTÉNUÉ (tableau II). — Les essais ont été effectués avec des mutants du virus de Sanarelli, mutants isolés par nous sur des lapins

TABLEAU II. — Virus atténué.

Réf.	1 d.m.i.			10 d.m.i.			100 d.m.i.			1.000 d.m.i.			10.000 d.m.i.		
	Ino.	Evol.	Tot.	Ino.	Evol.	Tot.	Ino.	Evol.	Tot.	Ino.	Evol.	Tot.	Ino.	Evol.	Tot.
1 Loiret 55	9	15	24	9	15	24	6	15	21	5	9	14	4	13	17
	9	27	36	9	7	16	5	10	15	4	10	14	4	11	15
				7	12	19	7	12	19						
2 Loir-et-Cher B	7	18	25	10	13	23	5	15	20	4	38	42	3	19	22
	11	14	25	10	15	25	5	29	34	4	15	19			
	10	17	27	10	12	22	5	18	21	5	14	17			
3 Loiret 13	9	31	40	6	65	71	5	15	20	4	60	64			
	7	10	17	6	21	27	5	19	24	5	60	65			
										5	25	28			
4 Loiret 13	8	13	21	7	22	29	5	20	25	5	20	25	5	13	18
	8	14	22	7	12	19	5	20	25	7	9	16	5	11	16
Moyennes	8,5	16,5	25	8,2	14,4	22,6	5	17,27	22,27	4,4	17,6	22	3,8	13,4	17,2

Les délais relevés pour les lapins qui ont guéri (soulignés d'un trait) n'entrent pas dans le calcul des moyennes ; les séquelles cutanées persistent si longtemps qu'il est difficile de préciser à quel moment l'évolution peut être considérée comme terminée.

domestiques provenant du Loiret et du Loir-et-Cher. Des 49 lapins qui ont contracté la myxomatose au cours de ces titrages, 4 ont guéri. 35 ont fait une maladie nodulaire ou mixte et 10 ont présenté un ensemble de symptômes aigus.

La lecture des moyennes calculées pour les diverses dilutions des

virus atténués montre qu'en ce cas, le facteur dose agit encore sur la durée d'incubation et dans le même sens. De ce point de vue, par conséquent, les mutants atténués se comportent comme les souches pleinement pathogènes. On notera, d'ailleurs, que les teneurs respectives en unités virulentes du matériel pathologique sont tout à fait comparables, quelle qu'en soit l'origine, lapin atteint de myxomatose

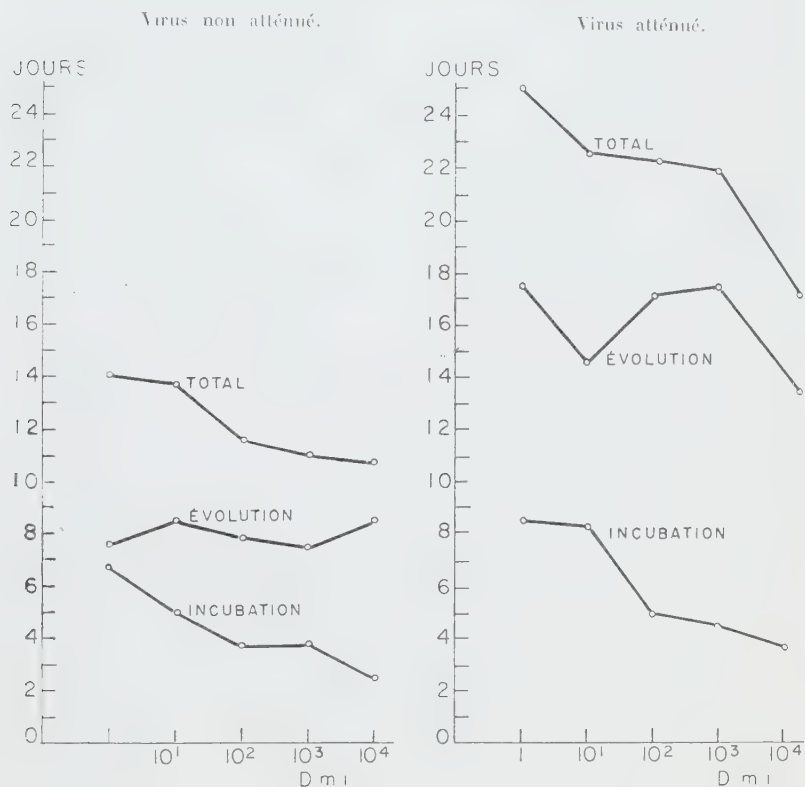


FIG. 1.

classique ou lapin atteint de myxomatose atténuée (10^5 à 10^7 au maximum).

Après inoculation de virus atténué, la période des troubles est plus longue qu'après inoculation de virus classique, mais il n'apparaît pas que sa durée soit en rapport avec le taux de la dilution. Elle varie, autour d'une moyenne de seize jours, avec des écarts marqués. On en jugera sur la figure 1 où se trouvent disposés, côte à côte, les diagrammes établis d'après les moyennes obtenues dans les tableaux précédents. A vrai dire, l'appréciation de la durée des manifestations pathologiques, chez les lapins atteints de myxomatose atténuée, com-

porte une marge d'erreur tenant à ce que, lorsque la maladie se prolonge notablement, quelque infection surajoutée peut contribuer à lui donner une issue fatale. Il reste néanmoins que, la période d'incubation révolue, d'importantes différences s'observent dans l'évolution des troubles et qui sont indépendantes de la dose de virus ; on notera, en confirmation de cela, que les cas de guérison se produisent aussi bien après inoculation de doses fortes que de doses faibles. Comment expliquer ces variations ? Deux hypothèses viennent à l'esprit : celle qui met en jeu l'hétérogénéité des souches atténuées et celle qui explique les faits par l'inégalité de résistance individuelle des lapins. On observe, quant à la forme, la gravité, la durée des manifestations pathologiques consécutives à l'inoculation des virus atténués, de telles différences d'un sujet à l'autre et d'un essai à l'autre que la première hypothèse nous a paru être la mieux fondée ; la question n'est pas tranchée, mais on ne saurait contester que le facteur individuel ait une part importante dans l'évolution des troubles ; son incidence est d'ailleurs décelable même chez les lapins atteints de myxomatose à virus classique, bien que, dans ce cas, elle soit considérablement amoindrie par la sévérité et la rapidité du processus.

En résumé, il n'apparaît pas que, dans sa forme clinique, non plus que dans la durée de ses manifestations objectives, la myxomatose expérimentale soit influencée par la dose de virus inoculée. Par contre, la période d'incubation qui précède l'apparition des premiers signes varie en raison inverse du nombre d'unités virulentes. Cette double constatation s'applique à la myxomatose classique, déterminée par un virus pleinement pathogène, et aux myxomatoses atténuées reconnaissant pour agents les mutants qui se sont présentés en France, dans la nature, en 1955. Ces faits semblent indiquer que le déclenchement des troubles, lié au nombre d'unités virulentes présentes dans l'organisme, ne se produit pas avant que leur multiplication *in situ* n'ait porté la quantité de virus à un certain minimum nécessaire et suffisant.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] JACOTOT (H.), VALLÉE (A.) et VIRAT (B.). *Bull. Acad. Vét. France*, 1955, 28, 307.

VALEUR DIAGNOSTIQUE DE L'INOCULATION AU COBAYE DES PRODUITS PATHOLOGIQUES CONTENANT DES BACILLES TUBERCULEUX RÉSISTANTS A L'ISONIAZIDE

par B. KREIS et Le QUAN SANG (*) (**).

(Hôpital Laennec, Clinique de Pneumo-Phthisiologie
[professeur ETIENNE BERNARD])

La maladie déterminée par l'inoculation sous-cutanée, à doses fortes (0,01 à 1 mg), chez le cobaye, de bacilles tuberculeux résistants à l'isoniazide peut ne pas se distinguer de la tuberculose expérimentale classique. D'autres fois, surtout lorsqu'il s'agit de bacilles dépourvus de catalase, on constate bien une lésion caséuse locale et une dissémination miliaire à distance ; mais l'animal ne meurt point et l'atteinte viscérale, loin de progresser, s'efface peu à peu, au point d'avoir habituellement disparu entre le sixantième et le quatre-vingt-dixième jour. La lésion locale persiste plus longtemps mais finit elle aussi par disparaître. Avec certaines souches l'examen macroscopique, voire histologique, des organes peut être alors entièrement normal et les cultures restent négatives. Il s'agit d'un type nouveau de tuberculose expérimentale qu'on peut appeler la tuberculose *régressive*.

La discrétion des lésions est encore plus grande lorsqu'on utilise de faibles doses de bacilles.

Nous avons inoculé à 12 cobayes des doses de 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} mg de bacilles H37Rv ayant subi une série de passages en milieu de Dubos additionné de 50 $\mu\text{g/ml}$ d'INH et dépourvus d'activité catalasique.

Avec cette souche de laboratoire, chez les animaux sacrifiés du quarante et unième au cent huitième jour, les critères habituels ne permettaient pas, dans 6 cas sur 12, de reconnaître la tuberculose. Il en a été ainsi, même pour la dose de 10^{-2} mg, quand l'autopsie a été tardive (cent huitième jour).

Une seconde expérience a consisté à inoculer 5 groupes de 2 cobayes, à la dose de 10^{-6} mg, avec des bacilles provenant d'une série de 5 souches résistantes, fraîchement isolées chez les malades et n'ayant pas subi de repiquages en présence d'isoniazide. La résistance de ces souches était supérieure à 20 $\mu\text{g/ml}$ et le taux de catalase nul pour 2 souches et faible pour les 3 autres. Un des cobayes fut sacrifié vers le quarante-cinquième jour, l'autre vers le soixante-quinzième jour. Trois souches donnèrent des lésions évidentes, mais le repiquage de ces lésions y montra la présence de bacilles sensibles et riches en catalase. Les 2 dernières souches n'entraînèrent pas de lésion au point d'inoculation. Avec l'une, on trouvait

(*) Aide-technique : M^{lle} Fournaud.

(**) Travail réalisé avec l'aide de la Caisse de Sécurité Sociale et de l'Institut National d'Hygiène (professeur BUCNARD).

cependant chez l'un des deux cobayes un ganglion inguinal à peine hypertrophié mais caséeux. Avec l'autre souche, les 2 cobayes ont été considérés comme entièrement normaux.

Ainsi, une dose d'environ 1 000 bacilles résistants, même fraîchement isolés, peut être insuffisante à provoquer chez le cobaye une tuberculose identifiable par les critères habituels d'autopsie.

Nous nous sommes demandé, dans ces conditions, si l'inoculation au cobaye restait une méthode de diagnostic cliniquement valable pour les produits pathologiques contenant de tels bacilles et si elle permettait d'en identifier la variété.

VALEUR DIAGNOSTIQUE DE L'INOCULATION DES PRODUITS CONTENANT DES BACILLES RÉSISTANTS À L'ISONIAZIDE. — *Expectoration.* — Nous nous sommes d'abord adressés à l'expectoration de malades longuement traités par l'isoniazide et restés bacillifères. Nous aurions voulu étudier des échantillons pauvres en bacilles, mais notre enquête nous a montré qu'ils étaient l'exception chez de tels malades. Quarante-sept cas ont été valables, groupant tous les degrés de résistance. Dans tous, le diagnostic de tuberculose a pu être porté à l'autopsie du cobaye.

La résistance était vingt et une fois au-dessus de 20 μ g, trois fois au-dessus de 5 μ g, quatorze fois au-dessus de 1 μ g, trois fois au-dessus de 0,1. Cinq fois les bacilles étaient sensibles à 0,1 μ g. Deux cobayes étaient inoculés par échantillon.

Il est intéressant d'analyser plus particulièrement les 16 cas où il s'agissait de bacilles résistants à 20 μ g et totalement dépourvus de catalase.

Onze fois la richesse bacillaire était considérable (≥ 10 bacilles par champ microscopique) : sur 19 cobayes, 19 présentèrent une lésion d'inoculation caséuse ; 9 des ganglions locaux très hypertrophiés ($\geq 0,40$ g) ; 12 des ganglions locaux caséux ; 2 des ganglions trachéobronchiques volumineux ($\geq 0,30$ g). Cinq seulement avaient une diffusion viscérale : 1 une grosse rate, 2 des granulations hépatiques, 2 des granulations pulmonaires.

Quatre fois les bacilles étaient rares : sur 6 cobayes, 5 montraient une lésion d'inoculation et des ganglions caséux, 1 des granulations pulmonaires.

Une fois l'examen microscopique était négatif (la culture donnait 5 colonies par tube). Les 2 cobayes sacrifiés au cinquante-troisième jour présentaient seulement, l'un une petite lentille de caséum au point d'inoculation, l'autre un minime point caséux dans un ganglion.

Dans les autres cas les lésions ont été dans l'ensemble plus importantes que dans le groupe des bacilles résistants à 20 μ g et dépourvus de catalase.

Pièces d'exérèse. — Nous avons abordé le problème par une autre voie en reprenant les résultats obtenus avec un matériel non destiné initialement à cette étude. Il s'agit de 323 pièces d'exérèse, provenant de tuberculeux traités, dont nous avons fait simultanément la culture et l'inoculation (1 seul cobaye par pièce). Sur 98 inoculations positives, 60 correspondaient à des bacilles résistants. Sur 57 cas où la culture a montré des bacilles résistants, cinquante-six fois l'inoculation a été positive. De plus, quatre fois l'inoculation a permis de mettre en évidence des bacilles résistants alors que la culture de la pièce était restée négative.

Trente souches résistaient à 20 μg , 7 à 5 μg , 12 à 1 μg , 11 à 0,1 μg . Trente-huit souches étaient sensibles à 0,1 μg .

Si l'on considère le groupe des inoculations pratiquées avec les 30 produits dont la culture a montré des bacilles *résistants à 20 μg* , on voit que les lésions ont été le plus souvent évidentes. Dans 24 cas les bacilles avaient été découverts à l'examen microscopique (et dix fois ils s'y montraient très nombreux). Tous les cobayes correspondants, sauf 6, présentaient des lésions caséuses (minimes ou importantes) au point d'inoculation. Quinze avaient de grosses adénopathies régionales (pesant plus de 0,40 g). Dans 15 cas il a même été observé des granulations ou une hypertrophie de la rate (qui pesait plus de 1 g). Dans les 6 cas où l'examen microscopique avait été négatif et la culture pauvre, le diagnostic était cinq fois possible par la lésion locale (il s'y ajoutait dans 2 cas une grosse rate). Dans le dernier cas le cobaye a été considéré comme exempt de toute lésion tuberculeuse et la culture de sa rate est restée négative : cependant l'intradermo-réaction s'était montrée nécrotique ; nous aurons à revenir sur ce cas. Enfin, 2 cas où la culture était négative se sont révélés par une lésion caséuse au point d'inoculation, d'où il a été isolé des bacilles résistants à 20 μg .

A l'autre extrémité de l'échelle, le tableau anatomique provoqué par les *bacilles sensibles à 0,1 μg* se caractérise : par l'énormité des lésions locales et des adénopathies loco-régionales (trente et une fois sur trente-huit, elles pèsent plus de 0,40 g, dont dix-neuf fois plus de 1 g, chiffre atteint une seule fois sur trente dans la série des bacilles résistants), par la diffusion importante au foie, à la rate (volumineuse dans 20 cas sur 38 avec parfois hypertrophie monstrueuse ; elle dépasse 2 g dans 10 cas, ce qui ne s'est produit qu'une seule fois dans la série des bacilles résistants), par l'atteinte des poumons et des ganglions trachéobronchiques (ceux-ci dépassent dans 15 cas le poids de 0,70 g, alors que le chiffre le plus élevé de la série résistante est 0,37).

En somme, dans deux séries bien différentes de produits pathologiques, expectoration de malades chroniques d'une part, pièces d'exérèse d'autre part, l'inoculation au cobaye s'est affirmée une excellente méthode de mise en évidence des bacilles résistants à l'INH. Comme il est habituel, elle s'est montrée légèrement supérieure à la culture.

Un certain nombre de difficultés ont cependant été rencontrées. Nous avons, en particulier, vu l'intradermo-réaction à la tuberculine au 1/10 se montrer discrète, à peine nécrotique ou redevenir négative un mois plus tard. Parfois même, elle reste négative de bout en bout malgré une tuberculose évidente et confirmée par la culture. Le cas s'est produit treize fois sur 66 cobayes inoculés avec des bacilles résistants à plus de 20 μg . Mais nous avons fait la même constatation huit fois sur 48 cobayes inoculés avec des bacilles sensibles : la déficience de l'allergie a donc été le fait de nos cobayes et non du type des bacilles inoculés.

Détermination du type de pouvoir pathogène. — Le tableau anatomique résultant de l'inoculation des bacilles résistants à l'INH permet de reconnaître qu'il s'agit d'une tuberculose régressive lorsqu'on inocule une dose connue de bacilles à plusieurs cobayes qu'on sacrifie à des intervalles espacés. Il n'en va pas de même lorsqu'on ne dispose que d'un seul cobaye sacrifié à une date fixe. Sans doute, si on a la notion d'une grande richesse bacillaire dans le matériel inoculé et que les lésions soient légères et purement locales, on peut soupçonner qu'il s'agit de ce type de tuberculose. Mais si les lésions sont plus disséminées il est impossible de se prononcer, comme en témoignent

les protocoles résumés plus haut. Ce qui caractérise en effet ce pouvoir pathogène ce n'est pas la *discrétion* des lésions mais leur *régression*.

D'ailleurs les tuberculoses discrètes après inoculation de produits riches en bacilles ne sont pas toujours dues à des bacilles résistants. Il nous est arrivé, chez un cobaye inoculé avec un fragment très riche en germes, de n'observer le quatre-vingt-douzième jour que des lésions peu importantes (masse caséeuse locale et ganglions modérément hypertrophiés) alors que les bacilles récupérés étaient parfaitement sensibles. Ce sont de tels cas qui ont fait parler de bacilles sensibles, de virulence diminuée par la thérapeutique : il s'agit peut-être simplement de souches spontanément atténuées donnant une tuberculose d'évolution lente, mais cependant progressive.

Des faits semblables sont constatés lorsqu'on a inoculé une souche comprenant une majorité de bacilles résistants mêlés de quelques bacilles sensibles, si l'autopsie intervient après la disparition des lésions dues aux bacilles résistants mais au début de l'extension des lésions dues aux bacilles sensibles. On trouve là aussi, à une période tardive après l'inoculation, des lésions discrètes d'où l'on isole des bacilles sensibles. Les lésions sont parfois particulièrement légères, comme si la première dissémination avait relativement vacciné l'animal contre les bacilles sensibles.

La détermination exacte du type de pouvoir pathogène même pour les produits riches en germes nécessite donc une étude nouvelle, pour laquelle l'examen du premier cobaye inoculé ne permet qu'une indication. La culture des bacilles à partir des lésions de l'animal, la détermination de leur résistance et de leur activité catalasique, montrant que les bacilles récupérés sont ou non identiques aux bacilles inoculés (si on les a cultivés), apporteront aussi un premier renseignement sur l'homogénéité de la population bacillaire.

Cas particulier des produits paucibacillaires. — Bien que les produits pathologiques que nous avons eus à examiner aient été le plus souvent riches en germes, on ne saurait se désintéresser des autres cas, où le diagnostic n'a pu être affirmé parfois qu'après une culture ou une réinoculation des organes ou des ganglions du cobaye.

Cette étude des produits pauvres en bacilles résistants doit nous conduire à améliorer notre technique habituelle d'autopsie du cobaye, qui est sans nul doute très grossière. Pour mettre en évidence des lésions discrètes et des bacilles rares, il ne faut pas s'en laisser toujours imposer par une intradermo-réaction négative. On doit examiner avec minutie le lieu d'inoculation, vérifier tous les ganglions par la coupe à la recherche d'un minuscule point caséeux, les peser, cultiver ceux qui paraissent un peu gros. L'examen histologique est, chez le cobaye comme chez l'homme, un complément précieux de l'examen macroscopique et qui peut donner une réponse quasi immédiate. Enfin, si l'autopsie est normale on peut être obligé de recourir à une culture systématique : nos résultats montrent qu'on doit préférer la culture des ganglions locaux à celle du foie ou de la rate.

La possibilité de la présence de rares bacilles résistants dans un produit pathologique oblige à utiliser ces méthodes presque par routine. Elles se montrent également nécessaires pour les bacilles de pouvoir pathogène normal s'ils sont inoculés en très faible quantité.

Une différence cependant est fondamentale : alors qu'on a l'habitude de retarder l'autopsie du cobaye d'autant plus que l'inoculation a été plus pauvre, il vaut mieux, pour mettre en évidence les lésions dues aux bacilles résistants, sacrifier précocement l'animal, entre le trentième et le quarante-cinquième jour. Plus tard les lésions régressent et peuvent cesser d'être apparentes. C'est dire l'intérêt de toujours inoculer deux cobayes dont l'un sera sacrifié précocement (trentième au quarante-cinquième jour) et l'autre beaucoup plus tard (quatre à douze mois).

Outre son intérêt diagnostique, cette façon de faire permet de mieux identifier le type de pouvoir pathogène, ce qui est particulièrement hasardeux sur un seul cobaye quand le matériel est pauvre en germes.

C'est ainsi que, sur 3 cobayes inoculés avec 3 produits négatifs à l'examen microscopique et dont la culture n'a donné chaque fois qu'une seule colonie, 2 cobayes sacrifiés les cent treizième et cent seizième jours ont été considérés comme normaux ; le troisième ne présentait qu'une adénopathie locale. Dans un cas, où la culture du fragment était négative, la tuberculose du cobaye ne s'est manifestée que par l'hypertrophie de la rate et des ganglions trachéobronchiques. Malgré la discrétion des lésions il s'est agi chaque fois de bacilles sensibles, de pouvoir pathogène normal.

CONCLUSIONS. — Certains bacilles tuberculeux isoniazido-résistants et pauvres en catalase peuvent déterminer chez le cobaye un type de tuberculose régressive qui leur est particulier. Cependant, à dose forte, ils déterminent au moins une lésion caséuse au point d'inoculation. L'expérimentation nous a montré qu'en faible quantité, au contraire, ils ne provoquent pas toujours de lésions visibles chez le cobaye.

L'étude de 102 échantillons nous a appris que ces bacilles se trouvaient habituellement en abondance dans le matériel pathologique humain. Dans ces conditions, 42 expectorations ont donné 42 inoculations positives et sur une série de 61 fragments pulmonaires contenant ces bacilles l'inoculation a été soixante fois positive alors que la culture ne l'était que cinquante-sept fois. En pratique, l'inoculation au cobaye conserve donc sa valeur comme méthode de recherche clinique des bacilles tuberculeux, même isoniazido-résistants.

Cependant, si le produit à étudier est pauvre en germes, il est nécessaire d'inoculer deux cobayes, dont l'un sera sacrifié du trentième au quarante-cinquième jour et l'autre sera laissé en vie quatre ou cinq mois au moins ; l'autopsie nécessite une particulière minutie. C'est à quoi doivent s'astreindre aujourd'hui les laboratoires à qui l'on demande d'inoculer des produits susceptibles de contenir des germes résistants, mais négatifs à l'examen microscopique. Cette technique s'impose dans tous les cas où l'on veut reconnaître s'il s'agit de bacilles à pouvoir pathogène normal ou de bacilles déterminant une tuberculose régressive.

**L'ACTION COMPARÉE *IN VITRO*
DE LA NYSTATINE ET DE LA TRICHOMYCINE
SUR DES CHAMPIGNONS LEVURIFORMES
DU GENRE *CANDIDA* PROVENANT DE VULVO-VAGINITES**

par A. LUTZ et M^{me} M.-A. WITZ.

(Laboratoire départemental de Bactériologie de Strasbourg
[Directeur : D^r A. LUTZ])

Dans un travail antérieur, l'un de nous [1] a montré l'intérêt d'associer un antibiotique antifongique, la candidine, aux antibiotiques antibactériens pour traiter efficacement certaines affections vaginales, et, en particulier, à titre prophylactique au cours de la grossesse, où la fréquence des infections à *Candida* augmente avec son âge.

L'examen de 620 prélèvements de leucorrhées nous a permis de mettre en évidence, par l'examen direct et la culture, dans 179 cas, des levures du genre *Candida*, à l'état saprophyte ou pathogène. En 1954, Grasset et ses collaborateurs [2], sur 424 prélèvements vaginaux pour leucorrhée, ont observé quarante-six fois (soit dans 11 p. 100 des cas) une infection mycosique.

Voici les groupes de *Candida* trouvés par quelques auteurs au cours d'examens systématiques de la flore des muqueuses génitales (tableau I).

TABLEAU I.

Auteurs	Nombre des pré- lève- ments	Nombre des sou- ches de termi- nées	G R O U P E S					Non classés
			Albi- cans	Kru- se	Tropi- calis	Gillier- mondii	Azyma- tique	
DAWKINS et coll. (3)	500	48	38	4	3			3
GARNIER (4)	500	91	70	3	13	1	1	
Statisti- que per- sonnelle		76	64	2	5	1		4

ERRATUM. — Avant-dernière colonne : au lieu de 1, lire 4.

Ce tableau nous montre la fréquence des porteuses de germes exposées aux vaginites à *Candida* selon les circonstances du terrain favorables à leur éclosion. Le groupe rencontré le plus fréquemment est *Candida albicans*, qui est le plus souvent à l'origine des vaginites.

D'après Carter [5] et Jones [6] et leurs collaborateurs, *Candida stellatoidea* (de Jones et Martins [7]) peut occasionner également des vulvo-vaginites. L'étude mycologique des souches de Grasset, provenant de vulvo-vaginites au cours de la grossesse, a permis à Segretain les identifications suivantes : 4 du groupe *albicans* ; 2 du groupe *krusei* ; 1 du groupe *tropicalis*.

Notre travail porte sur 52 souches isolées de leucorrhées mycosiques avérées, dont 21 au cours de la grossesse, 15 au cours de thérapeutiques antibiotiques (pénicilline, pénicilline-streptomycine, terramycine, etc.), 5 au cours d'investigations hormonales.

Nous rapportons ici l'action *in vitro* de la nystatine et de la trichomycine sur ces 52 souches isolées sur milieu de Sabouraud contenant 50 microgrammes de framycétine par centimètre cube et sur milieu sélectif de Littman [8]. Leur détermination a été faite d'après leurs caractères morphologiques et physiologiques. Pour la fermentation des sucres nous avons employé la méthode utilisée par Langeron et Guerra [9] complétée par Ansel et Gauthier [10].

Cinquante et une des souches étudiées appartiennent au groupe *Candida albicans* et 1 au groupe *tropicalis*.

Le milieu de culture utilisé est une modification d'un milieu décrit par Williams et ses collaborateurs [11], à savoir :

Glucose, 20 g ; $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 3 g ; PO_4KH_2 , 2 g ; $\text{SO}_4\text{Mg } 7 \text{ H}_2\text{O}$, 250 mg ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$, 250 mg ; ZnSO_4 , 1,0 mg ; MnCl_2 , 10 mg ; FeCl_3 , 0,5 mg ; $\text{SO}_4\text{Cu } 5 \text{ H}_2\text{O}$, 0,1 mg ; KI, 0,1 mg ; L-asparagine, 3 g ; hydrolysate de caséine sans vitamines, 200 mg ; inositol, 5 mg ; thiamine 2 mg ; Ca pantothénate 0,3 mg ; ac. nicotinique, 0,6 mg ; pyridoxine, 0,3 mg ; biotine, 0,005 mg ; extrait de levure Difco, 1 g ; eau distillée q. s. pour 1 000 cm^3 (pH = 7).

MÉTHODE UTILISÉE. — Nous avons employé la méthode des dilutions ; l'ensemencement a été aussi homogène que possible à raison de 10^{-6} germes approximativement. La nystatine en poudre (Mycostatine Squibb) utilisée titrant 3 440 unités par milligramme, a été dissoute dans une solution de tampon phosphate à pH 7 contenant 70 p. 100 d'alcool éthylique. Les solutions et les dilutions en eau distillée stérile ont été renouvelées pour chaque série de titrages. La trichomycine qui a servi dans ce travail est une trichomycine commerciale (Sanyo chemical). Cet antibiotique est extrait des cultures de *Streptomyces hachijoensis* découvert par S. Hosoya et ses collaborateurs (Université de Tokyo) [12]. Son action expérimentale sur les *Trichomonas* et les *Candida* et son application en gynécologie ont fait l'objet des travaux de Hosoya [12, 13, 14], Onoda [15], Magara [16] et leurs collaborateurs.

Nos résultats *in vitro* sont exposés dans les tableaux II et III.

a) *Action fongistatique*. — Le tableau II montre que toutes ces souches de *Candida albicans* sont inhibées par des taux de nystatine compris entre 2 et 12 unités, ce qui correspond aux données de nombreux auteurs et en particulier à celles de Drouhet [17]. Les concentrations minima inhibitrices de trichomycine, relativement faibles, sont comprises entre 0,05 et 0,4 unité par centimètre cube. Les six

souches inhibées par 10 ou 12 unités de nystatine ne nécessitent pas systématiquement des taux plus élevés de trichomycine.

b) *Action fongicide.* — Pour déterminer l'action fongicide, nous avons repiqué sur milieu de Sabouraud, après centrifugation, lavage et remise en suspension, les tubes où il n'y avait pas de croissance apparente. Voici quelques résultats observés pour les deux antibio-

TABLEAU II. — Action fongistatique.

1. — CANDIDA ALBICANS

C.M.I.			C.M.I.			C.M.I.		
N° de souche	Nys-taticholane en unités	Tri-chomycine en unités	N° de souche	Nys-taticholane en unités	Tri-chomycine en unités	N° de souche	Nys-taticholane en unités	Tri-chomycine en unités
1	4	0,2	18	6	0,2	35	4	0,05
2	12	0,1	19	5	0,2	36	3	0,2
3	5	0,2	20	6	0,1	37	6	0,4
4	3	0,2	21	8	0,2	38	4	0,2
5	4	0,05	22	5	0,2	39	5	0,1
6	4	0,2	23	7	0,4	40	5	0,4
7	5	0,1	24	4	0,2	41	8	0,3
8	5	0,4	25	5	0,2	42	6	0,2
9	10	0,2	26	3	0,1	43	4	0,2
10	4	0,05	27	2	0,05	44	5	0,2
11	5	0,2	28	4	0,05	45	8	0,2
12	5	0,4	29	2	0,1	46	10	0,2
13	8	0,4	30	3	0,2	47	4	0,2
14	10	0,2	31	7	0,2	48	8	0,2
15	10	0,2	32	5	0,2	49	5	0,2
16	6	0,2	33	5	0,2	50	5	0,4
17	12	0,4	34	4	0,1	51	4	0,2
2- CANDIDA TROPICALIS								
1	2	0,05						

(*) Lectures après quarante-huit heures de séjour à l'étuve.

tiques, les lectures étant faites quatre jours après le repiquage et séjour à l'étuve (tableau III).

Ce tableau confirme l'action bactéricide des deux antibiotiques.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet synergique des deux antibiotiques *in vitro*.

Ces données expérimentales sont confirmées par les remarquables effets cliniques obtenus par Bret et Bardiaux [18] en France, et Pace et Schantz [19] aux Etats-Unis dans le traitement des affections vaginales à *Candida* par la nystatine.

L'association de cet antibiotique aux antibiotiques antibactériens per-

mettra, par ailleurs, d'éviter la flore de substitution observée par l'utilisation des antibactériens seuls.

Mais dans certains cas on a pu observer des vaginites à *Trichomonas* au décours du traitement d'une mycose rebelle. Dans une étude portant sur 126 vaginites à *Trichomonas*, nous avons observé dans 11,8 p. 100 des cas l'association *Trichomonas vaginalis*-*Candida*, d'où l'intérêt de la trichomycine, active sur les deux microorganismes, comme l'a montré Onoda, seule ou associée aux antibiotiques antibactériens, qui peut éviter

TABLEAU III.

Souches		I	II	III	IV	V
NYS- TA- TI- NE	Concentrations fongistatiques en unités	3	4	2	4	5
	Concentrations fongicides en unités	3	8	10	12	20
TRI- CHO- MYCI NE	Concentrations fongistatiques en unités	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2
	Concentrations fongicides en unités	0,6	1,2	1,2	1,2	0,8

l'installation d'une vaginite secondaire, soit à *Trichomonas*, soit à *Candida*.

En conclusion, ce travail montre :

1° La fréquence des champignons levuriformes sur les muqueuses vaginales, avec prédominance très nette du groupe *Candida albicans*.

2° Les propriétés fongistatiques et fongicides de la nystatine et de la trichomycine. Les taux fongistatiques de la trichomycine sont très voisins pour les diverses souches et ses concentrations fongicides particulièrement faibles.

3° L'intérêt d'associer ces antibiotiques antifongiques aux antibiotiques antibactériens et en particulier la trichomycine en présence d'une infection mixte à *Candida* et à *Trichomonas*, afin d'éviter les infections secondaires dues à une flore de substitution.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LUTZ (A.) et WURCH (Th.). *Bull. Féd. Soc. Gynécol. Obst. de langue française*, 1954, **6**, 115.
- [2] GRASSET (J.), SÉNÈZE (J.) et GAUTHIER (R.). *Bull. Gynécol. Obst.*, 1954, **6**, 151.
- [3] DAWKINS (S. M.), EDWARDS (J. M. B.) et RIDDELL (R. W.). *Lancet*, 1953, 1229.
- [4] GARNIER (G.). *Presse méd.*, 1956, **64**, 888.
- [5] CARTER (B.), BAYARD, JONES (C. P.), CLAUDIUS (P.), ROSS (R. A.) et THOMAS (W.). *Am. J. Obst.*, 1940, **39**, 213.
- [6] JONES (C. P.), CLAUDIUS (P.), CARTER (B.), BAYARD, THOMAS, WALTER (L.), ROSS (R. A.) et CREDICK (R. N.), d'après LOCK (F.), DUKES YOW (M.) et GRIFFITH (M.). *Surg. Gyn. Obst.*, 1948, **87**, 410.

- [7] JONES (C. P.) et MARTIN (D. S.). *Am. J. Obst. Gynecol.*, 1938, **35**, 98.
- [8] LITTMAN. *Science*, 1947, **106**, 109.
- [9] LANGERON (M.) et GILBERT (P.). *Ann. Parasitol.*, 1938, **16**, 162, 429 et 481.
- [10] ANSEL (M.) et GAUTHIER (C.). *Ann. Parasitol.*, 1954, **29**, 148.
- [11] WILLIAMS (R. J.), McMAHAN (J. R.) et EAKIN (R. E.). *Univ. Texas Pub.*, 1941, **37**, 31.
- [12] HOSOYA (S.), KOMATSU (N.), SOEDA (M.) et SONODA (Y.). *J. exp. Med. Japan.*, 1952, **22**, 505.
- [13] HOSOYA, SOEDA, KOMATSU, WATANABE, OKADA et ONODA. *J. Antib. Ser. B.*, 1953, **6**, 49.
- [14] HOSOYA (S.), SOEDA (M.), OKADA (K.), WATANABE (S.) et KOMATSU (N.). *J. Antib. Ser. A.*, 1953, 98.
- [15] ONODA, HOSOYA, SOEDA, KOMATSU et WATANABE. *J. Antib. Ser. B.*, 1953, **6**, 49.
- [16] MIZURA (M.), YOKOUTI (E.), SENDA (I.) et AMINO (E.). *Antib. and Chem.*, 1954, **4**, 433.
- [17] DROUHET (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 298.
- [18] BRET (A.-J.) et BARDIAUX (M.). *Presse méd.*, 1956, **64**, 671.
- [19] PACE (H. R.) et SCHANTZ (S. I.). *J. Am. med. Assoc.*, 1956, **162**, 268.

PRODUCTION RAPIDE DE TOXINES STAPHYLOCOCCIQUES PAR INJECTION GAZEUSE EN CULTURE PROFONDE AGITÉE

par M. ROUYER, J. PILLET, M^{me} B. ORTA et M^{lle} M.-J. NICOL.

(Institut Pasteur, Annexe de Garches)

La production de la toxine staphylococcique par culture en surface nécessite la manipulation de nombreux flacons de Fernbach de faibles capacités (1,3 litre) et le montage de tuyaux et bouchons destinés à la circulation des gaz. Elle provoque de nombreux mécomptes qui nous incitent à essayer une technique analogue à celle utilisée avec tant de succès, depuis une dizaine d'années, dans la fabrication industrielle de la pénicilline [1].

MATÉRIEL ET TECHNIQUE. — 1^o *Matériel.* — Avant d'entreprendre l'expérimentation en grande cuve nous avons pratiqué les essais à plus petite échelle, néanmoins le volume de la culture reste largement suffisant pour étudier les propriétés de la toxine produite.

Le récipient utilisé est un flacon de Woolf en Pyrex à 3 tubulures, d'une capacité de 20 l, contenant 17 l de milieu standard [2].

Deux bouchons percés sont fixés aux deux petites tubulures latérales : l'un est traversé par un tuyau permettant les prélèvements ou l'addition

de l'antimousse et l'autre par un tube effilé qui sert à injecter le mélange gazeux 5 cm au-dessous du bicône de l'agitateur (1).

Une ferrure fixe au goulot central, un bouchon de 45 mm de diamètre, percé de 4 trous. Dans le premier passe un tube pour l'ensemencement.

Le second est traversé par une tige en acier inoxydable munie d'un écran permettant le freinage du vortex.

Le troisième livre passage à un tube surmonté d'un presse-étoupe. Ce tube supporte les paliers de l'arbre attelé au moteur à une extrémité et vissé au mélangeur à l'autre (le tout en acier inoxydable). L'agitateur est constitué par deux troncs de cône réunis par leur grande base à l'aide d'un barreau permettant une circulation interne et externe du liquide.

La rotation du bicône amorce un circuit continu en double 8 créant une aspiration à ses extrémités et un refoulement à son diamètre maximum. C'est ainsi que les bulles gazeuses injectées par l'orifice de la tubulure débouchant sous le bicône sont aspirées par la dépression et refoulées finement émulsionnées dans toutes les directions, sous l'action de la force centrifuge de la zone équatoriale.

Enfin le quatrième sert à l'évacuation des gaz.

La stérilité du mélange gazeux (80 p. 100 d'air et 20 p. 100 CO_2) injecté est obtenue simplement par passage à travers du coton cardé bourré dans un flacon de 1 l en pyrex, sur le fond duquel a été soudée une tubulure. Tout ce matériel une fois monté est stérilisé à l'autoclave trente minutes à 110°.

TECHNIQUE. — Après ensemencement avec la souche Wood 52 le flacon est mis à incuber à 37° ; l'agitateur mis en marche tourne à environ 700 tours/minute et 1/2 l à 3/4 de litre/minute du mélange gazeux est injecté par la tubulure débouchant sous le bicône.

Des prélèvements stériles sont effectués : le premier quatre heures après l'ensemencement, puis matin et soir pendant toute la durée de l'expérience.

RÉSULTATS. — a) *Production de la toxine α* . — Le tableau I, qui résume une de nos expériences, montre que le départ de la culture est très rapide : en quatre heures le pH baisse de 6/10 d'unité pour atteindre son minimum en vingt-deux heures avec 8/10 d'unité, il remonte ensuite progressivement jusqu'à dépasser de 2/10 d'unité son pH de départ.

Après vingt-deux heures de culture la toxine titre 5 unités hémolytiques par centimètre cube pour atteindre un titre maximum en quarante-huit heures avec 20 unités au centimètre cube. On constate ensuite un plateau d'une trentaine d'heures, puis une diminution très progressive du titre.

b) *Propriétés de la toxine obtenue*. — Les tests usuels pratiqués sur la toxine obtenue ne permettent pas de différencier celle-ci de la toxine staphylococcique produite par la méthode classique de culture en surface. En effet, elle neutralise spécifiquement le sérum anti- α et possède

(1) Mélangeurs bicônes Thiberge, Rueil-Malmaison.

in vivo les propriétés hémolytique, dermonécrotique et létale de la toxine α . Comme celle-ci elle se transforme sous l'action du formol (4,5 p. 1000) et de la chaleur (sept jours à 40°) en anatoxine. Cette anatoxine peut être purifiée et concentrée par l'acide trichloracétique dans les mêmes conditions que l'anatoxine provenant de la toxine obtenue par culture en surface. Eprouvée chez le lapin elle possède les mêmes propriétés antigéniques que celle-ci.

TABLEAU I.

Temps d'incubation en heures	pH	Titre de la toxine α
0	7,1	0
4	6,5	0
22	6,3	5
28	6,75	10
44	7	18
48	7,2	20
52	7,3	18
70	7,4	18
76	7,2	15

TOXINE β . — La production de la toxine β en culture en surface est particulièrement difficile à réaliser d'une façon régulière, de très grandes variations de titre étant souvent constatées d'une semaine à l'autre. Nous avons retrouvé ces difficultés dans nos essais de culture en masse concernant cette toxine. En effet, sur trois expériences pratiquées, si l'une a donné des résultats pouvant être considérés comme très bons (10 unités hémolytiques au centimètre cube en soixante-six heures), les deux autres n'ont permis d'obtenir que de la toxine de titre très bas. L'étude *in vitro* de la toxine provenant de la première expérience a montré que celle-ci présentait les propriétés hémolytiques et antigéniques caractéristiques de la toxine β produite par culture en surface.

Sa transformation en anatoxine (8 p. 1000 de formol et dix jours à 40°), et la purification et concentration de celle-ci par l'acide tri-

chloracétique dans les conditions habituelles, donne une anatoxine aux propriétés analogues à celle produite par la technique classique.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS. — Nos essais de production de toxines staphylococciques en culture profonde nous ont permis de préciser les conditions nécessaires à l'obtention en quantité importante d'une toxine de titre convenable. Ces conditions sont les suivantes :

1° Il est indispensable de disperser très finement le mélange gazeux dans toute la masse du liquide ;

2° Si cette condition est remplie le coefficient d'aération, rapport $\frac{\text{Surface}}{\text{Volume}} = \frac{1}{h}$ dans le cas d'un cylindre, qui imposait de cultiver sur une faible hauteur de milieu, n'est plus à respecter et des essais dans une cuve profonde de grande capacité peuvent être envisagés avec de grandes chances de succès ;

3° La technique étudiée supprime les nombreuses manipulations du procédé classique et a l'avantage de diminuer de trois à quatre fois le temps nécessaire à la toxinogenèse ;

4° L'étude des propriétés caractéristiques des toxines α et β ainsi obtenues ne permet pas de les distinguer des toxines α et β produites par culture en surface.

Avant d'affirmer toutefois l'identité totale des deux types de toxine, il serait nécessaire de faire, en particulier, une étude complète de leurs propriétés physiques et chimiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] STEFANIAK (J.), GALEY (F.), BROWN (C.) et JOHNSON (J.). *Ind. Eng. Chem.*, 1946, **38**, 666.
[2] MERCIER (P.) et PILLET (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 809.

ÉTUDE MICROBIOLOGIQUE DE LA RHIZOSPHÈRE DU BLÉ

I. — GROUPES FONCTIONNELS MICROBIENS ET STADES DE CROISSANCE

par J. RIVIÈRE.

(Institut National Agronomique, Laboratoire de Microbiologie)

Les travaux sur la rhizosphère du blé sont nombreux, mais les résultats sont assez confus et les techniques d'étude souvent fort dissemblables. Starkey [1] montra que l'effet rhizosphère est maximum à l'épiaison, alors que Timonin [2] trouva une action importante peu de temps après la germination. Quant à l'effet rhizosphère sur les

grands groupes fonctionnels des microorganismes au sein du sol, les résultats sont contradictoires. Pour Starkey [3] et Tribounskaïa [4], il y a une augmentation de l'activité fixatrice dans la rhizosphère du blé ; pour Krassilnikov [5], une diminution, alors que Daste [6] voit d'abord un effet stimulant net au début de la croissance, puis ensuite un effet inhibiteur. Krassilnikov [7] montre une augmentation massive de cellulolytiques, Berjzova [8] un grand nombre de bactéries dénitrifiantes. Seule l'école canadienne de Lochhead [9] a fait une étude magistrale de l'effet rhizosphère sur les caractères nutritionnels des bactéries stimulées.

Nous nous sommes attaché à étudier l'effet rhizosphère sur les grands groupes fonctionnels des microorganismes au sein du sol durant les phases principales de la croissance du blé.

TECHNIQUE. — Toutes nos expériences ont été faites en pots placés à l'extérieur. Nous avons utilisé la variété de blé de printemps Fylgia et une terre de jachère (1) afin d'avoir au départ un effet rhizosphère nul.

Les analyses microbiologiques ont été réalisées à des stades de la croissance du blé bien déterminés :

- 1° 9 jours après le début de la germination ;
- 2° 64 jours après le début de la germination, soit au tallage ;
- 3° 87 jours après le début de la germination, soit à l'épiaison ;
- 4° 140 jours après le début de la germination, soit à la maturation.

Les prélèvements de la rhizosphère ont été faits d'après la technique de Katznelson [10] que nous avons légèrement modifiée. Dans chaque cas nous avons pratiqué une numération de la flore totale, de la flore fongique, des Actinomycètes, des fixateurs aérobies non symbiotes, des nitrificateurs, des cellulolytiques aérobies, et une mesure de l'activité de l'ammonification, de la dénitrification et de l'amylolyse suivant les techniques de J. Pochon [11].

RÉSULTATS. — Nous ne donnerons ici que le résumé des résultats (tableau I).

A. *Rhizosphère éloignée*. — La microflore aérobie fixatrice d'azote n'est légèrement stimulée qu'au tallage ainsi que la microflore nitreuse. La microflore nitrique est légèrement stimulée à l'épiaison.

La dénitrification est légèrement stimulée à la germination.

La stimulation de la flore totale et de la flore fongique n'apparaît qu'au tallage avec un rapport R/S respectivement de 4,3 et de 11,2.

En ce qui concerne l'ammonification, la microflore cellulolytique et les Actinomycètes, il n'y a aucun effet rhizosphère à n'importe quel stade.

Pour l'amylolyse, aucun effet rhizosphère net, il serait plutôt négatif.

B. *Rhizosphère proche*. — L'effet rhizosphère est beaucoup plus accentué, mais très variable suivant les stades de la croissance.

La microflore fixatrice d'azote montre un effet rhizosphère maximum

(1) Nous remercions M. le Directeur de la Station d'Agronomie du C. N. R. A. de Versailles, qui nous a permis de prélever des échantillons de terre dans de bonnes conditions agronomiques.

TABLEAU I. — Effet rhizosphère du blé sur les groupes fonctionnels des micro-organismes du sol.

		Germination		Tallage		Epiaison		Maturation	
		Effet	R/S	Effet	R/S	Effet	R/S	Effet	R/S
		Rhizosphère		Rhizosphère		Rhizosphère		Rhizosphère	
Microflore	RE	0	1	+	6,5	0	1	ε	2,5
fixatrice d'azote	RP	0	1,85	+++	40	+	3,15	ε	2,5
Microflore	RE	0		0		0		0	
ammonifiante	RP	++		+		+		+	
Microflore	RE	0	0,3	+	5,6	0	1,6	0	0,5
nitreuse	RP	0	1	+++	56	+	5,6	0	1
Microflore	RE	0	1	0	1	+	5,6	0	0,35
nitrique	RP	++	46	++++	160	++	28	0	1
Microflore	RE	+		0		0		0	
dénitrifiante	RP	++		++		+		+	
Microflore	RE	0	1	0	1	0	1	0	1
cellulolytique	RP	-	0,6	---	0	---	0	-	0,2
Microflore	RE	0		0		0		0	
amylolytique	RP	0		+		+		+	
Champignons	RE	0	0,99	+	11,2	0	1,4	0	0,93
	RP	0	0,95	++++	274	+	7,8	+	10,7
Actinomycètes	RE	0	1,9	ε	3,3	0	0,68	0	0,6
	RP	0	1,9	+	10,4	++	16,7	0	1,4
Flore totale	RE	0	1,7	+	4,3	0	0,8	0	1,5
	RP	+	3	+++	27,7	++	16,8	+	5,4

au tallage (R/S = 40), nul à la germination, faible à l'épiaison (R/S = 3) et à la maturation (R/S = 2,5). L'ammonification a une stimulation nette lors de la germination, faible aux autres stades. La microflore nitreuse a un effet rhizosphère maximum au tallage (R/S = 56), faible à l'épiaison (R/S = 5,6), nul aux autres stades.

L'effet rhizosphère dans la microflore nitrique est moyen à la germination (R/S = 46), maximum au tallage (R/S = 160), diminuant à l'épiaison (R/S = 28) et nul à la maturation. Il y a une action stimulante de la dénitrification à tous les stades, marquée surtout lors de la germination et du tallage.

La microflore cellulolytique est faiblement inhibée lors de la germination et de la maturation, totalement inhibée lors du tallage et de l'épiaison.

La flore fongique montre une action stimulante considérable lors du tallage (R/S = 274), diminuant ensuite pour se maintenir à l'épiaison et à la maturation.

Les Actinomycètes sont stimulés moyennement au tallage (R/S = 10,4) avec un maximum lors de l'épiaison (R/S = 16,7) ; aux autres stades, l'effet rhizosphère est nul. La microflore totale a une stimulation légère à la germination, maximum au tallage (R/S = 27,7), marquée encore à l'épiaison (R/S = 16,8), faible lors de la maturation (R/S = 5,4).

CONCLUSIONS. — Dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placé, l'effet rhizosphère éloigné est très faible. L'effet rhizosphère proche est beaucoup plus intense, qu'il s'agisse de la microflore

totale, fongique, des actinomycètes ou des divers groupes fonctionnels, sauf pour l'action inhibitrice vis-à-vis des cellulolytiques aérobies. Seule l'amyolyse est peu stimulée. L'action maximum se situe presque toujours au moment du tallage, qui paraît représenter un stade tout particulièrement intéressant pour l'effet rhizosphère. Nos travaux en cours ont pour objet de préciser la nature de cette action.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] STARKEY. *Sol Sci.*, 1929, **27**, 433.
- [2] TIMONIN. *Canad. J. Res. (c)*, 1940, **18**, 307.
- [3] STARKEY. *Sol Sci.*, 1929, **27**, 355.
- [4] TRIBOUNSKAIA. *Microbiologia* (USSR), 1954, **23**, 282.
- [5] KRASSILNIKOV. *Microbiologia* (USSR), 1934, **3**, 343.
- [6] DASTE. *Rev. gén. Bot.*, 1950, **57**, 685.
- [7] KRASSILNIKOV. *Microbiologia* (USSR), 1935, **5**, 87.
- [8] BERJOZOVA. *Dissertation Moskva*, 1946.
- [9] LOCHHEAD. *Sol Sci.*, 1949, **67**, 63.
- [10] KATZNELSON. *Bot. Rev.*, 1948, **14**, 543.
- [11] POCHON. *Technique d'analyse microbiologique du Sol*. Masson, édit.

Remarque : RE = Rhizosphère éloignée ; RP = Rhizosphère proche ; R/S = Rhizosphère
 ———— Témoïn ; O = action nulle ; e = faible action positive ; + = action positive
 nette ; ++ = action positive moyenne ; +++ = action positive forte ;
 ++++ = action positive très importante ; — = action inhibitrice nette ;
 ——— = action inhibitrice totale.

ACTION DE LA CORTISONE SUR L'ÉVOLUTION DE LA RAGE CHEZ LA SOURIS

par E.-R. BRYGOO et A. DODIN.

(Institut Pasteur de Madagascar [Directeur : J. COURBURIER])

De très nombreuses publications traitent de l'action de la cortisone ou de l'ACTH sur telle ou telle maladie infectieuse, bactérienne ou virale.

Spain, Molomut et Haber [1] étudièrent l'action de la cortisone chez la souris, sur les tissus de granulation, sur l'action phagocytaire et sur la formation des exsudats inflammatoires aigus, et observèrent d'importantes modifications de ces différentes activités.

Plusieurs auteurs ont étudié son action dans la rage naturelle ou expérimentale. En 1954, Veeraraghavan et Balasubramanian [2] rapportaient des essais négatifs avec l'ACTH au cours de l'infection rabique humaine et expérimentale.

Nous avons cherché à systématiser l'action de la cortisone sur l'évo-

lution de la rage de la souris et nous avons étudié les répercussions du traitement sur les lésions histologiques.

Nous avons utilisé comme virus des rues le deuxième passage sur souris d'un virus qui venait d'être isolé à partir d'un bulbe de chien. Le virus fixe est celui que nous utilisons pour la production de vaccin ; c'est une souche Pasteur reçue à Tananarive en 1954 et régulièrement entretenue sur lapin. Les animaux d'expérience étaient des souris blanches « suisses » pesant de 18 à 20 g.

Nous appellerons TMP le temps moyen d'apparition des paralysies et TMS le temps moyen de survie après l'inoculation. Ces deux temps sont exprimés en jours.

A. INOCULATION INTRACÉRÉBRALE DE VIRUS DES RUES. — 1° Dans une première expérience les souris reçurent 2,5 mg par jour de cortisone par voie intrapéritonéale pendant 10 jours, en commençant le jour même de l'inoculation du virus.

a) Sur 10 témoins « cortisone », 3 sont morts d'hypercorticisme les huitième et neuvième jours ;

b) Les 12 témoins « virulence » moururent du onzième au quinzième jour avec un TMS de 13,08.

c) Les 12 souris traitées sont mortes dans les mêmes délais avec un TMS de 14,7.

On pouvait conclure de cette première expérience que, malgré une dose limite de cortisone, l'évolution de la maladie n'avait pas été modifiée de façon appréciable.

2° Une deuxième expérience fut alors pratiquée, mais avec une dose journalière moitié moindre de cortisone (1,25 mg), afin d'éliminer l'influence défavorable possible d'un excès de cortisone.

a) Sur les 10 témoins « cortisone » aucun ne mourut. L'un d'eux présentait au dixième jour des signes d'hypercorticisme : hirsutisme, œdème, mais ces symptômes disparurent avec l'arrêt de la drogue.

b) Chez les souris témoins « virulence » le TMS fut de 10 et le TMP de 8,5.

c) Chez les souris traitées, les temps moyens correspondants furent de 9,7 pour la survie et de 8,4 pour l'apparition des paralysies.

La cortisone à la dose de 1,25 mg administrée pendant 10 jours n'avait donc pas modifié l'évolution de la rage à virus des rues inoculée par voie intracérébrale.

3° Si la cortisone ne pouvait modifier l'apparition des symptômes ni la durée de l'évolution de la maladie lorsqu'elle était administrée aussitôt après l'inoculation d'épreuve, on pouvait se demander si, administrée plus tardivement, elle ne pourrait pas prolonger la période clinique de la maladie.

Dans cette expérience, nous avons administré 1,25 mg de cortisone par jour à toutes les souris du lot dès qu'apparurent chez l'une d'elles les premiers signes de paralysies (en pratique le septième jour).

a) Les témoins « virulence » virent apparaître leurs paralysies pour un temps moyen de 7,75 jours, le TMS fut de 11,37 ;

b) Pour les 10 souris traitées le TMP fut de 8,3 et le TMS de 11,5.

Il n'y avait donc pas d'allongement significatif de la durée de la période clinique de la maladie.

B. INOCULATION INTRAPÉRITONÉALE DE VIRUS DES RUES. — L'absence d'action de la cortisone pouvait être la conséquence du mode d'inoculation du virus ; nous avons donc essayé la voie intrapéritonéale.

1° Les souris reçurent pendant 10 jours 1,25 mg de cortisone par jour dès l'inoculation intrapéritonéale. Les paralysies apparurent du huitième au dixième jour, la mortalité s'échelonna du neuvième au quatorzième jour. Le TMP fut de 9, le TMS de 11,08, alors que pour les témoins les chiffres correspondants étaient de 9,5 pour le TMP et de 16,8 pour le TMS.

Au cours de cette expérience la cortisone n'eut aucune action favorable sur l'apparition des paralysies, elle semble même avoir raccourci d'une manière importante l'évolution de la maladie.

2° Dans une deuxième expérience la dose quotidienne de cortisone (1,25 mg) fut administrée à partir du moment où la paralysie apparut chez une des souris du lot (ici le huitième jour). Le TMP fut de 12,8 chez les souris traitées contre 9,5 chez les témoins ; par contre, le TMS fut de 14,5 chez les souris traitées pour 16,8 chez les témoins.

Pour cette expérience, la cortisone semblait avoir retardé l'apparition des paralysies, mais considérablement abrégé la durée de la période clinique de la maladie.

3° Nous avons recommencé l'expérience précédente en augmentant le nombre des animaux (10 au lieu de 6). Chez les souris traitées nous avons obtenu les chiffres suivants : TMP, 9,4 ; TMS, 16,5, alors que pour les témoins nous obtenions TMP, 9,8 et TMS, 17,9.

Si cette expérience ne confirmait pas le retard dans l'apparition des paralysies chez les souris traitées par la cortisone, elle confirmait les résultats obtenus au cours des deux expériences précédentes en ce qui concerne la diminution de la durée générale de la maladie chez les animaux traités.

C. INOCULATION INTRACÉRÉBRALE DE VIRUS FIXE. — 1° Dans une première expérience nous avons administré de la cortisone à la dose de 1,25 mg pendant les cinq premiers jours après l'inoculation de virus. Cette médication fut pratiquement sans effet :

Le TMP des souris traitées fut de 8,6 contre 8,75 chez les témoins ;

Le TMS des souris traitées fut de 11,4 contre 10,75 chez les témoins.

2° Dans une deuxième expérience, nous avons administré la cortisone dès l'apparition de paralysie chez une des souris inoculées, mais nous avons de plus pratiqué les inoculations avec différentes dilutions de virus fixe afin de contrôler s'il ne serait pas possible de mettre en évidence une action de la cortisone lorsque diminue la quantité de virus inoculée.

Quatre dilutions furent utilisées, les souris du premier lot recevant une dose virulente mille fois plus forte que celles du quatrième lot.

Il n'y eut pas de différence appréciable entre l'évolution de la maladie des souris traitées et des souris témoins des trois premiers lots. Par contre, pour le quatrième lot (souris ayant reçu la dose la plus faible de virus), si le TMP est le même chez les souris traitées que chez les souris témoins (10 jours), le temps de survie est allongé chez les souris traitées : toutes les souris se paralysèrent, mais quatre seulement moururent (TMS de 17), deux dépassèrent les limites d'obser-

vation (1 mois). Chez les témoins, mort des six souris avec un TMS de 14. Ce résultat isolé ne permet pas de conclure à une action favorable certaine de la cortisone, car nous étions peut-être à la limite du pouvoir pathogène de notre suspension virale. Des recherches complémentaires seraient nécessaires pour préciser ce point.

D. CONTRÔLE HISTOLOGIQUE. — L'examen histologique des cerveaux montra des modifications des lésions encéphaliques sous l'action de la cortisone. Par comparaison avec les cerveaux des souris témoins ayant reçu le même virus, à la même concentration, mais sans traitement par la cortisone, les cerveaux des souris traitées présentaient les caractéristiques suivantes :

1° Dans la rage des rues :

Présence d'une importante hyperémie diffuse portant sur les vaisseaux et sur les capillaires ;

Diminution de l'importance des nodules encéphalitiques et des manchons périvasculaires ;

Pas de différence nette du nombre ou du volume des corps de Negri.

2° Dans la rage à virus fixe :

Augmentation importante des signes congestifs ;

Diminution en nombre et en taille des manchons périvasculaires et des nodules encéphalitiques ;

Peu de variation des lésions dégénératives.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS. — 1° L'administration de cortisone à la dose de 1,25 mg par jour pendant 10 jours par voie intrapéritonéale ne modifie de façon sensible ni l'apparition des paralysies ni le temps de survie des souris inoculées par voie intracérébrale avec un virus rabique.

2° Chez les souris inoculées par voie intrapéritonéale avec un virus des rues l'administration de cortisone semble sans action sur l'apparition des paralysies ; par contre, elle semble raccourcir les délais d'évolution de la maladie.

3° L'administration de cortisone modifie l'aspect des lésions histologiques des souris inoculées avec les virus rabiques.

Nous tenons à exprimer notre gratitude à M. J. Levaditi pour avoir bien voulu examiner nos préparations histologiques.

Note : Ce travail était terminé et rédigé lorsque nous avons eu connaissance de la publication de M. G. Thierry : « Premiers résultats de l'étude de l'action de diverses hormones et du nucléinate de sodium sur le virus rabique », *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 945.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SPAIN (D. M.), MOLOMUT (N.) et HABER (A.). *Science*, 1950, **112**, 335.
- [2] VEERARAGHAVAN (N.) et BALASUBRAMANIAN (A.). *Indian J. med. Res.*, 1954, **42**, 9.

**ACTION DE LA CORTISONE
ASSOCIÉE AU SÉRUM HYPERIMMUN
SUR L'ÉVOLUTION DE LA RAGE DES RUES
CHEZ LA SOURIS**

par A. DODIN et E.-R. BRYGOO.

(*Institut Pasteur de Madagascar* [Directeur : J. COURDURIER])

Depuis quelques années, de nombreux travaux ont établi la valeur des sérums hyperimmuns dans la prophylaxie de la rage animale ou humaine. Dans la note précédente nous avons montré que l'administration de cortisone ne modifiait pas de façon sensible l'évolution de la rage à virus des rues chez la souris tout en ayant une certaine action sur l'aspect des lésions histologiques de l'encéphale. Nous avons cherché quelle pouvait être l'action de la cortisone sur l'évolution de la rage des rues chez des souris traitées par un sérum hyperimmun.

Nous avons utilisé comme virus des rues le deuxième passage sur souris d'un virus qui venait d'être isolé à partir d'un bulbe de chien et, comme animaux d'expérience, des souris blanches « suisses » pesant de 18 à 20 g. Le sérum hyperimmun provenait de l'Institut Pasteur de Paris (lot n° 461 d'août 1955). Nous l'avons administré par voie intrapéritonéale à la dose de 1/10 de millilitre d'une solution au 1/20. La cortisone était administrée également par voie intrapéritonéale en une injection quotidienne de 1,25 mg.

Nous appellerons TMP le temps moyen d'apparition des paralysies et TMS le temps de survie après l'inoculation. Ces deux temps sont exprimés en jours.

A. INOCULATION INTRACÉRÉBRALE DE VIRUS DES RUES. — Dans cette expérience, alors que la cortisone était administrée dès l'inoculation virulente et pendant 10 jours, le sérum n'était injecté qu'au moment de l'apparition de paralysies chez une des souris du lot (huitième jour) et continué pendant 5 jours. Alors que toutes les souris témoins mouraient entre le huitième et le onzième jour (TMP, 7,75 et TMS, 11,37), les souris traitées à la fois par de la cortisone et du sérum présentaient un retard dans l'apparition des paralysies (TMP, 8,6), mais la durée de la maladie était comparable ou raccourcie (TMS, 10,7). Par contre, chez les souris qui n'avaient reçu que du sérum, on observait deux survies dépassant les limites de l'observation (30 jours).

B. INOCULATION INTRAPÉRITONÉALE DE VIRUS DES RUES. — L'inoculation intracérébrale réalisant des conditions expérimentales particulièrement sévères, nous avons utilisé pour les expériences suivantes la voie intrapéritonéale.

1° Nous avons d'abord essayé l'administration de la cortisone (poursuivie 10 jours) et du sérum (pendant 5 jours) dès l'inoculation d'épreuve. Tous les témoins virulence sont morts en moins de 11 jours (TMS, 9,5), mais, alors que tout le lot de souris (6) qui n'avait reçu que du sérum survivait et dépassait les limites de l'observation, seules trois des six souris traitées par cortisone + sérum survivaient, les trois autres mourant en 9,9 et 14 jours.

Cette expérience confirmait l'action défavorable de la cortisone sur le traitement de l'infection rabique de la souris par le sérum qui s'annonçait dans la première expérience.

2° Dans ce deuxième essai le sérum et la cortisone furent administrés pendant le même temps, mais plus tardivement : dès l'apparition de paralysies chez une des souris du lot (dixième jour). Mortalité de 100 p. 100 chez les témoins. Chez les souris traitées par le sérum seul, 4 sur 6 survivent ; parmi celles ayant reçu sérum + cortisone 3 sur 6 survivent. Dans ce cas la différence n'est pas suffisamment nette pour permettre une conclusion si l'on ne tient compte que de ces chiffres isolés.

3° Pour le troisième essai nous avons repris les mêmes conditions d'administration du sérum et de la cortisone : dès l'apparition de paralysies chez l'une des souris du lot (le septième jour pour cette expérience).

a) 100 p. 100 de mortalité chez les souris témoins : TMP, 9,8 ; TMS, 17,9.

b) Sept survivants sur les 10 traitées par sérum seul.

c) Par contre, mortalité de 100 p. 100 pour les 10 souris ayant reçu cortisone + sérum : TMP, 13 ; TMS, 16,5. Les paralysies sont apparues plus tardivement que chez les témoins, mais la durée de l'évolution a été plus courte, ainsi que nous l'avons déjà observé plusieurs fois chez les souris soumises à l'administration de cortisone.

Cette expérience confirme encore l'action défavorable de la cortisone. Si nous reprenons les chiffres obtenus pour l'ensemble des quatre expériences, nous observons :

1° Chez les souris témoins non traitées, une mortalité de 100 p. 100 : 38 sur 38.

2° Chez les souris traitées par le sérum seul, une mortalité de 52,5 p. 100 : 21 sur 40.

3° Chez les souris ayant reçu cortisone + sérum, une mortalité de 85,4 p. 100 : 35 sur 41.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS. — L'administration de cortisone exerce une action défavorable sur le traitement de la rage des rues de la souris par le sérum hyperimmun.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Etudes sur le collagène. X. Modifications apportées aux combinaisons *in vitro* collagène-mucopolysaccharides par des polyosides bactériens, par S. BAZIN et A. DELAUNAY.

Isolement de la gorge d'un enfant d'une souche virulente de virus poliomyélitique sans présence d'anticorps homologues, par M.-C. CARRÉ.

Vaccination par BCG normal et BCG INH-résistant en présence et en l'absence d'administration d'INH, par J. BRETEY et G. CANETTI.

Etudes sur la toxine R2 du bacille typhique. VI. Action toxique expérimentale. a) Caractères généraux de l'intoxication ; b) Effets sur la température des animaux ; c) Effets sur la formule leucocytaire ; d) Effets sur la glycémie, par M. DIGEON et M. RAYNAUD.

Préparation d'antitoxine anti-diphtérique par immunisation des chevaux avec des anatoxines diphtériques purifiées, par E. H. RELYVELD, O. GIRARD R. CORVAZIER et M. RAYNAUD.

Activité antibactérienne de certains dérivés du thymol, par M. RAYNAUD, R. ROYER, B. BIZZINI et E. BISAGNI.

AVIS IMPORTANT

L'abondance des communications adressées ou remises à la *Société de Microbiologie* aboutissant à rendre pratiquement impossible la tâche du Comité de Rédaction dans le court espace de temps disponible entre la séance et l'envoi à l'imprimeur des manuscrits, nombre de corrections demandées aux auteurs ne peuvent avoir lieu que sur épreuves, ce qui entraîne des frais de composition supplémentaires ou des délais de parution.

Afin de remédier à cet état de choses, le Bureau de la Société a décidé que ne pourront dorénavant être présentés aux séances que les communications ou mémoires dont le texte intégral aura été remis au Secrétaire *dix jours au plus tard avant la date de la séance*. Tout manuscrit parvenant après cette date sera reporté à la séance suivante.

Le Secrétaire général :
P. LÉPINE.

Le Gérant : G. MASSON.